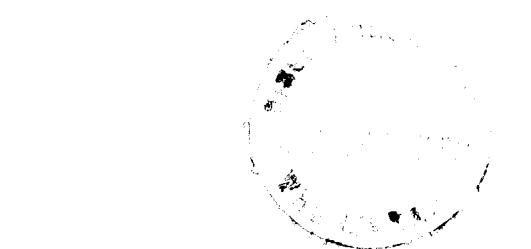


Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical

Etabli sur la base d'un manuel antérieur d'Etienne Lévy-Lambert



**ORGANISATION
MONDIALE
DE LA SANTÉ
GENÈVE 1982**



Les publications de l'Organisation mondiale de la Santé bénéficiant de la protection prévue par les dispositions du Protocole No 2 de la Convention universelle pour la Protection du Droit d'Auteur. Pour toute reproduction ou traduction partielle ou intégrale, une autorisation doit être demandée au Bureau des Publications, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse. L'Organisation mondiale de la Santé sera toujours très heureuse de recevoir des demandes à cet effet. Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part du Secrétariat de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. La mention de firmes et de produits commerciaux n'implique pas que ces firmes et produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

80/4726 – ACCENT/INDEX – 5000

IMPRIME EN ANGLETERRE

Table des matières

	Pages
Préface	1
But du Manuel	2
Comment utiliser le Manuel	3
Activité du technicien de laboratoire	4
Unités de mesure	5

PREMIÈRE PARTIE TECHNIQUES GÉNÉRALES DE LABORATOIRE

1. Le microscope: réglage et entretien	13
2. Récipients et petit matériel de laboratoire	27
3. Nettoyage de la verrerie	29
4. Stérilisation	33
5. Destruction des prélèvements et du matériel souillé	39
6. Mesures de volume	42
7. Balances	48
8. Centrifugeurs	52
9. L'eau du laboratoire	56
10. Travail du verre	64
11. Récipients pour prélèvements	68
12. Expédition de prélèvements à un autre laboratoire	71
13. Fixation et envoi de biopsies pour l'anatomo-pathologie	75
14. Inscription des prélèvements; registres du laboratoire et rapports mensuels	78
15. Rangement, inventaire, commande de fournitures	85
16. Electricité: montages électriques simples	87
17. Plomberie: opérations simples	94
18. Premiers secours en cas d'accident au laboratoire	98
19. Plan d'un laboratoire médical périphérique	102
20. Matériel nécessaire à l'équipement d'un laboratoire périphérique	104

DEUXIÈME PARTIE A. PARASITOLOGIE

Introduction	111
1. Selles: Que faut-il chercher? Comment recueillir les échantillons	113
2. Selles: Préparation des lames	116
3. Technique spéciale pour la recherche des œufs d'oxyure	119
4. Oeufs et larves de parasites intestinaux	122
5. Vers adultes trouvés dans les selles	143
6. Amibes, flagellés et ciliés: formes mobiles	147
7. Amibes, flagellés et ciliés: kystes	155
8. Choix d'une méthode de concentration parasitaire	162
9. Concentration parasitaire à l'aide d'une solution saline (Willis)	163
10. Concentration parasitaire au formol-éther ou au MIF	165
11. Méthode de concentration pour larves d'anguillules (Harada-Mori)	168
12. Comment consigner les résultats des examens de selles	170
13. Expédition de selles pour recherche de parasites	173
14. Recherche chimique du sang dans les selles	175
15. Recherche des œufs de <i>Schistosoma haematobium</i> dans les urines	178
16. Autres parasites susceptibles d'être découverts dans les urines	181
17. Oeufs de douve du poumon; autres parasites	183
18. <i>Trichomonas</i> : examen direct des écoulements génito-urinaires, etc.	186
19. Préparation d'une goutte épaisse et coloration de Field	189
20. Coloration de Giemsa (gouttes épaisses et étalements minces)	193
21. Identification des parasites du paludisme	196
22. Microfilaires sanguines: recherche à l'état frais, concentration	204
23. Microfilaires sanguines: coloration et identification	209
24. Onchocercose: recherche des microfilaires cutanées	215
25. Trypanosomes: recherche dans le sang, concentration	220
26. Trypanosomes: recherche dans la sérosité ganglionnaire	226

B. BACTÉRIOLOGIE

	Page
Introduction	231
27. Préparation et fixation des étalements	232
28. Coloration de Gram	235
29. Germes mis en évidence par examen bactériologique direct	238
30. Gonocoque: recherche directe dans le pus urétral. Syphilis	243
31. Bacille tuberculeux. Coloration de Ziehl-Neelsen (à chaud)	249
32. Bacille tuberculeux. Coloration de Kinyoun (à froid)	257
33. Lèpre: recherche du bacille dans les nodules et les lésions cutanées	259
34. Lèpre: recherche du bacille dans la muqueuse nasale	264
35. Peste: recherche du bacille	265
36. Expédition d'échantillons de selles	268
37. Examen direct de frottis de gorge. Envoi d'échantillons	270
38. Examen bactériologique direct des urines	275
39. Prélèvement d'eau pour analyse bactériologique	279

C. SÉROLOGIE

40. Expédition d'échantillons de sérum sanguin et de sang séché pour examen sérologique	285
41. Réaction du VDRL	288

D. MYCOLOGIE

42. Pityriasis versicolor: examen direct	297
43. Teignes: examen direct	300

TROISIÈME PARTIE

A. EXAMEN DES URINES

1. Obtention des échantillons et aspect des urines	305
2. Densité et pH de l'urine	307
3. Glucose: recherche et dosage dans les urines	311
4. Protéines: recherche et dosage dans les urines	313
5. Pigments biliaires dans les urines	316
6. Présence d'urobilinogène dans les urines	319
7. Composés cétoniques dans les urines	320
8. Utilisation de papiers indicateurs ou de comprimés-réactifs pour les examens d'urines	323
9. Sédiments urinaires	325
10. Tests de grossesse	336

B. EXAMEN DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

11. Prélèvement du LCR: Aspect	339
12. Concentration leucocytaire (numération) dans le LCR	342
13. Dosage du glucose dans le LCR (glycorachie)	344
14. Dosage des protéines dans le LCR (albuminorachie)	345
15. Examen microscopique du LCR	347

C. HÉMATOLOGIE

	Page
16. Les éléments cytologiques du sang	351
17. Prélèvement de sang veineux	353
18. Concentration leucocytaire (numération des leucocytes)	360
19. Concentration érythrocytaire (numération des hématies)	366
20. Hémoglobine: dosage de la cyanméthémoglobin, méthode photométrique	371
21. Hémoglobine: utilisation d'un comparateur	375
22. Hémoglobine: dosage par la méthode de Sahli	377
23. Fraction de volume érythrocytaire	379
24. Concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire	386
25. Préparation d'un étalement mince	387
26. Coloration des étalements minces	391
27. Formule leucocytaire et examen des leucocytes	397
28. Hématies anormales: examen microscopique	407
29. Epreuve de falcification des hématies	411
30. Réticulocytes	414
31. Vitesse de sédimentation érythrocytaire (VS)	418
32. Temps de saignement: méthode de Duke	421
33. Temps de coagulation du sang total: méthode de Lee et White	423
34. Rétraction et temps de lyse du caillot	425

D. CHIMIE SANGUINE

35. Dosage du glucose sanguin et céphalo-rachidien: méthode à l'orthotoluidine	429
36. Dosage de l'urée: méthode à la diacétyle-monoxime et à la thiosemicarbazide	432

E. TRANSFUSION SANGUINE

37. Les groupes sanguins: rappel théorique	435
38. Groupage ABO avec les sérum-tests	437
39. Groupage ABO avec les hématies-tests	443
40. Groupages Rhésus	448
41. Epreuve de compatibilité	453
42. Dépistage des donneurs O dangereux	456
43. Prélèvement et conservation du sang	458
44. Sang: groupage et épreuve de compatibilité: plan de travail	463
Les réactifs et leur préparation	465
Index	479



Préface

Le présent ouvrage constitue une version révisée d'un Manuel rédigé pour l'OMS par Etienne Lévy-Lambert et publié en 1973, les principales révisions étant dues à Mlle M. Cheesbrough et au Dr L.M. Prescott. Cette première version a été mise à l'épreuve de la pratique et le texte révisé a tenu compte d'observations et de suggestions émanant d'experts de plusieurs pays, ainsi que de membres du personnel de l'OMS.

Le présent Manuel est surtout destiné aux assistants de laboratoire des pays en développement, qui pourront s'y référer aussi bien pendant leur formation que lors de leurs activités ultérieures. Il peut également être utile pour des travaux de routine dans les laboratoires médicaux et de santé publique. On s'est attaché à retenir essentiellement des techniques simples, sûres et peu coûteuses, compte tenu des ressources limitées dont disposent les petits laboratoires.

Les illustrations ont été révisées par Lynne Cullen Dennis et Pierre Neumann.

L'OMS exprime sa gratitude à tous ceux qui ont contribué à la préparation de ce Manuel.

But du Manuel

Laboratoires

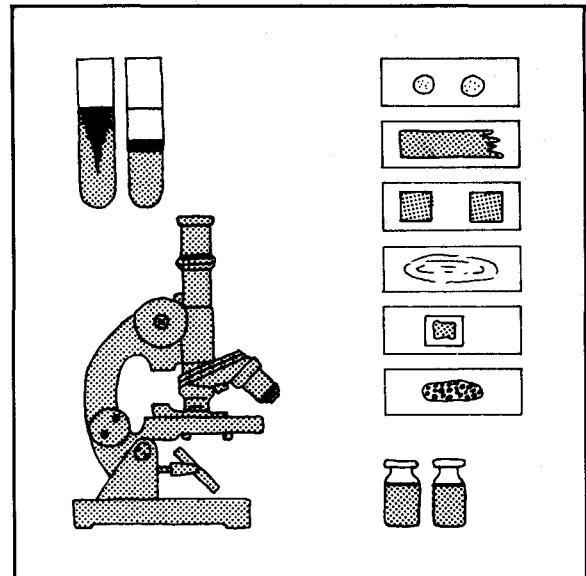
Ce Manuel est surtout destiné aux laboratoires médicaux des pays en voie de développement. Il a été spécialement préparé à l'intention des laboratoires de l'échelon périphérique de ces pays, c'est-à-dire aux petits et moyens laboratoires des hôpitaux régionaux, ainsi qu'aux dispensaires et aux centres de santé ruraux où le technicien de laboratoire travaille souvent seul.

Il utilise un langage aussi simple que possible, tout en respectant, partout où cela s'impose, la terminologie technique usuelle.

Techniques

Le Manuel traite uniquement des examens directs qui n'exigent qu'un microscope ou un matériel simple, par exemple:

- recherche des parasites dans les selles
- recherche des parasites du paludisme dans le sang
- recherche du bacille tuberculeux dans les crachats
- recherche des pigments biliaires dans les urines
- numération leucocytaire
- mode d'expédition d'échantillons de selles aux laboratoires spécialisés, pour la recherche du vibrion cholérique.



Le but visé est de décrire les techniques de base qui sont utiles aux laboratoires périphériques et qui peuvent être appliquées avec un matériel courant relativement limité.

Certains laboratoires ne seront peut-être pas en mesure de pratiquer la totalité de ces examens. Ainsi, le laboratoire d'un centre de santé rural peut ne pas être équipé pour procéder à la réaction du V.D.R.L. ou à la recherche de telle ou telle substance dans le sang.

Comment utiliser le Manuel

1. Comment trouver la technique désirée

Le Manuel comprend trois parties correspondant aux rubriques suivantes:

Première partie — Techniques générales de laboratoire

Deuxième partie — Parasitologie
Bactériologie
Sérologie
Mycologie

Troisième partie — Examen des urines
Examen du liquide céphalo-rachidien
Hématologie générale
Chimie sanguine et transfusion

La table des matières contient une liste des techniques classées par rubriques et l'index une liste par ordre alphabétique. Par exemple, les références à la coloration de Gram se trouvent:

- dans la table des matières sous Bactériologie (2^{ème} partie, B, 28)
 - dans l'index alphabétique à Coloration, Gram.
-

2. Réactifs

Chaque réactif a reçu un numéro d'ordre. La description de chaque technique indique le réactif nécessaire, avec son numéro d'ordre. A la fin du Manuel, on trouvera la liste de tous les réactifs classés par ordre alphabétique, avec leur numéro d'ordre, leur composition, leur mode de préparation et de conservation. Par exemple, pour la coloration de Gram, on indique comme réactif le violet de gentiane (Réactif No. 56). La composition et le mode de préparation du violet de gentiane se trouvent dans la liste des réactifs placée à la fin du Manuel, par ordre alphabétique, page 465.

3. Matériel

Le Manuel ne prévoit pas d'articles trop coûteux ou difficiles à trouver. Le matériel nécessaire à l'application de chaque technique est indiqué au début de la section correspondante. On trouvera dans l'ouvrage (p. 104-107) une liste de l'équipement dont un laboratoire a besoin pour effectuer tous les examens décrits dans le Manuel.

Si certains articles manquent, le technicien fera de son mieux pour y suppléer en utilisant du matériel divers: les flacons vides qui contenaient les antibiotiques pour injection (flacons type Pénicilline) ou d'autres médicaments peuvent être récupérés; les portoirs pour tubes à essais ou les râteliers à lames peuvent être fabriqués sur place; une boîte ronde en métal peut servir de bain-marie, etc.

Activité du technicien de laboratoire

Le technicien de laboratoire est chargé des examens de laboratoire dont il doit soumettre les résultats au médecin (ou à son représentant), en agissant dans l'intérêt des malades. Il a donc un rôle important à jouer pour aider ceux-ci à recouvrer la santé. D'autre part, il recueille, au cours de ses travaux, une masse d'information sur les malades et leurs problèmes de santé. Il doit, tout comme le médecin, considérer cette information comme strictement confidentielle et ne la communiquer qu'au praticien qui a demandé l'examen. Si les malades veulent connaître ces résultats, on leur dira de s'adresser au médecin.

La plupart des pays du monde ont défini des normes élevées applicables à la conduite éthique et professionnelle des médecins et des techniciens de laboratoire qualifiés. Il importe que tout technicien de laboratoire chargé d'effectuer des analyses médicales ait à cœur de les respecter.

Unités de mesure

Le technicien de laboratoire a affaire à des grandeurs aussi bien qu'à des unités de mesure, et il importe de comprendre la différence qui les sépare.

On désigne sous le terme de *grandeur* toute propriété physique mesurable, ce qui donne à ce mot un sens différent de celui qu'il a dans le langage courant. Dans la terminologie scientifique, hauteur, longueur, vitesse, température et courant électrique sont autant de grandeurs, qui se chiffrent en unités de mesure.

Grandeurs et unités pour la présentation des rapports de laboratoire

Le travail de laboratoire oblige constamment à mesurer des grandeurs et à utiliser, pour exprimer les résultats, des unités de mesure. Etant donné que la santé — voire la vie — d'un malade peut dépendre du soin avec lequel on procède à ces mesures et de la façon dont on note les résultats, il est essentiel de comprendre à fond (a) les grandeurs que l'on mesure, (b) les noms attribués à ces grandeurs et (c) les unités utilisées pour les mesurer.

8

Nouvelles unités et nouveaux noms de grandeur

Depuis près de deux siècles, les spécialistes s'efforcent de mettre au point un système standardisé simple d'unités de mesure. Au long des années, divers systèmes ont été proposés, mais ils se sont tous, à une exception près, révélés peu satisfaisants, pour une raison ou pour une autre. Seule fait exception une version du système métrique introduite en 1901. Depuis, ce système a été progressivement développé, et il a reçu en 1960 le nom de *Système international d'unités* et le sigle international "SI". Les unités de mesure qui font partie de ce système sont dites "unités SI". Plusieurs pays ont déjà adopté les unités SI en médecine, dans d'autres le processus est en cours, et pour d'autres enfin on n'en est encore qu'au stade de la planification. De plus, dans certains pays, le changement ne se fait pas à l'échelon national, mais à l'échelon local (voire dans un seul laboratoire à la fois).

Parallèlement à l'introduction des unités SI, les spécialistes ont préparé une liste systématique des noms de grandeur. Dans certains cas, on a conservé les appellations traditionnelles, mais dans d'autres elles étaient inexactes, trompeuses ou ambiguës, et on les a remplacées par de nouvelles désignations.

Le présent Manuel utilise essentiellement les unités SI et les nouveaux noms de grandeur. Toutefois, comme dans de nombreux cas, les régions ou les laboratoires où il sera utilisé n'ont pas encore opéré la conversion, les unités et les noms de grandeur traditionnels sont également mentionnés, ainsi que les relations entre les deux systèmes.

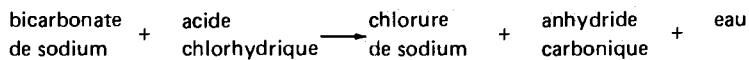
On trouvera ci-après une brève description des unités SI et des nouveaux noms de grandeur utilisés dans le Manuel.

Unités SI utilisées dans le Manuel

Toutes les unités SI sont fondées sur sept *unités SI de base*. Le Manuel n'en utilise que quatre, qui figurent dans le tableau suivant:

Grandeur	Nom de l'unité SI de base	Symbol
longueur	mètre	m
masse	kilogramme	kg
temps	seconde	s
quantité de matière	mole	mol

Les trois premières unités vous sont certainement familières, encore que la grandeur dénommée "masse" puisse appeler certaines précisions. Par contre, des explications sont certainement nécessaires en ce qui concerne la quantité de matière. La *masse* est le nom exact de ce que l'on désigne communément sous le terme de "poids". (Le mot "poids" a un sens technique: c'est une mesure de la force d'attraction terrestre qui s'exerce sur une masse donnée. En revanche, la masse est indépendante de l'attraction terrestre. Dans l'usage courant, on ne distingue pas entre ces deux termes; de plus, on parle de "pesée" pour désigner la mesure d'une masse). La "quantité de matière" et son unité, la *mole*, revêtent une grande importance en médecine et jouent un rôle capital dans le travail de laboratoire. Quand deux ou plusieurs substances chimiques réagissent ensemble, elles ne le font pas en fonction de leur masse. Ainsi, dans la réaction



1 kg (1 kilogramme) de bicarbonate de sodium ne réagit pas avec 1 kg d'acide chlorhydrique. En revanche, 1 mol (1 mole) de bicarbonate de sodium réagit avec 1 mol d'acide chlorhydrique. Chaque fois que des substances chimiques réagissent entre elles, elles le font en fonction de leur masse moléculaire relative (nouveau nom de ce que l'on appelait autrefois "poids moléculaire"). L'emploi de la mole, qui est fondée sur la masse moléculaire relative, donne donc la mesure des valeurs équivalentes de deux ou plus de deux substances différentes (ce qui ne serait pas le cas avec des unités de masse).

La grande majorité des unités SI sont appelées *unités SI dérivées*. Elles s'obtiennent en multipliant une unité de base par elle-même, ou en associant deux unités de base ou davantage par une simple multiplication ou une simple division, selon le cas. On trouvera ci-dessous quelques unités dérivées courantes.

Grandeur	Nom de l'unité SI dérivée	Symbol
superficie	mètre carré	m^2
volume	mètre cube	m^3
vitesse	mètre par seconde	m/s

L'unité de superficie correspond à un mètre x un mètre = un mètre carré; l'unité de volume à un mètre x un mètre x un mètre = un mètre cube, et l'unité de vitesse est le mètre par rapport à la seconde = un mètre par seconde. Toutes les unités SI dérivées sont formées avec la même simplicité. Toutefois, dans certains cas, il est nécessaire d'effectuer plusieurs multiplications ou divisions, ce qui complique l'expression du résultat; ainsi, l'unité de pression est le kilogramme divisé par (mètre x seconde x seconde). Pour éviter cet écueil, ces unités ont reçu un nom spécial — le pascal dans le cas de l'unité de pression.

Si l'on ne disposait que des unités SI de base et des unités SI dérivées, certaines mesures seraient difficiles, car ces unités sont souvent trop grandes ou trop petites. Ainsi, le mètre est une unité beaucoup trop grande pour permettre de mesurer commodément le diamètre d'une hématie. Pour tourner cette difficulté, le SI comporte une série de *préfixes SI* qui permettent de former des multiples et des sous-multiples décimaux des unités SI. Ceux qui figurent dans le Manuel sont énumérés ci-après.

<i>Préfixe</i>	<i>Symbole</i>	<i>Facteur de multiplication ou de division</i>
méga	M	mult. par 1 million ($\times 10^6$)
kilo	k	mult. par 1000 ($\times 10^3$)
centi	c	div. par 100 ($\times 0,01$ ou 10^{-2})
milli	m	div. par 1000 ($\times 0,001$ ou 10^{-3})
micro	μ	div. par 1 million ($\times 10^{-6}$)
nano	n	div. par 1 milliard ($\times 10^{-9}$)

Ainsi, 1 kilomètre (symbole: km) = 1000 mètres (1000 m); 1 centimètre (1 cm) = 0,01 mètre (0,01 m ou 10^{-2} m); 1 millimètre (1 mm) = 0,001 mètre (0,001 m ou 10^{-3} m) et 1 micromètre (1 μ m) = 0,000 001 mètre (0,000 001 m ou 10^{-6} m). La plupart de ces préfixes sont déjà bien connus dans leur application au mètre. Il suffit de se rappeler qu'ils ont le même sens lorsqu'ils sont appliqués à une autre unité.

Nouveaux noms de grandeur

On a vu ci-dessus que, parallèlement aux changements d'unités SI, certains nouveaux noms de grandeur ont été introduits. Ils ne sont pas très nombreux; des noms tels que longueur, hauteur, superficie, volume et vitesse sont restés inchangés. La plupart des termes nouveaux concernent la concentration et les grandeurs apparentées. La difficulté vient de ce qu'on peut exprimer de plusieurs manières différentes des notions qui étaient toutes rendues, autrefois, par le terme de "concentration", ce qui était gênant. On leur a désormais attribué à chacune un nom spécial. Mais avant de traiter de ces nouveaux noms, il faut expliquer l'unité de volume appelée "litre". C'est une unité bien connue, et on peut être surpris de ne pas la voir figurer parmi les unités SI dérivées. Si ce n'est pas le cas, c'est que le litre n'est pas, à strictement parler, une unité SI. L'unité SI (dérivée) de volume est le mètre cube, mais elle est beaucoup trop grande pour permettre de mesurer commodément les liquides organiques. Aussi utilise-t-on un sous-multiple du mètre cube: le décimètre cube. Le préfixe "décî" ne figure pas dans la liste donnée plus haut parce qu'il n'est pas employé dans le présent Manuel, mais il correspond à une division par 10 (ou à une multiplication par 0,1 ou par 10^{-1}). Un décimètre est donc égal à 0,1 m, et un décimètre cube à $0,1 \times 0,1 \times 0,1 \text{ m}^3 = 0,001 \text{ m}^3$ (ou 10^{-3} m^3 , soit un millième de mètre cube). Le "litre", bien que ne faisant pas partie du système SI, a été approuvé comme nom spécial du décimètre cube. Le litre et ses sous-multiples, comme le millilitre, sont surtout utilisés pour mesurer des volumes relativement faibles de liquides, et parfois de gaz; les volumes de solides et les grands volumes de liquides et de gaz se mesurent généralement en mètres cubes ou en un de ses multiples ou sous-multiples. Le litre est une unité très importante, car c'est celle qu'emploie le laboratoire médical pour mesurer toutes les concentrations ou quantités connexes. On peut cependant observer (par exemple sur des récipients gradués) des volumes marqués en sous-multiples du mètre cube. Aussi trouvera-t-on plus loin une table de conversion d'un système à l'autre.

Cela dit, revenons maintenant aux différents noms utilisés pour exprimer la concentration. Supposons tout d'abord que nous avons une solution saline. La masse de sel dissous rapportée au volume de la solution est dite *concentration massique*. On peut en donner une définition plus générale en disant que c'est "la masse d'un composant donné (par exemple une substance dissoute) par rapport au volume de la solution". Elle s'exprime en grammes (ou milligrammes, microgrammes, etc.) par litre. Le système SI fait relativement peu appel à la concentration massique; elle n'est utilisée que pour les substances dont la masse moléculaire relative ("poids moléculaire") est floue, comme les protéines.

Supposons maintenant que nous ayons une autre solution saline, pour laquelle cette fois la quantité de sel dissous est exprimée en "quantité de matière". La quantité de matière saline (c'est-à-dire le nombre de moles de sel) contenue dans la solution par rapport au volume de la solution est appelée *concentration de quantité de matière*. On pourrait en donner la définition plus générale suivante: c'est "la quantité de substance d'un composant donné (c'est-à-dire la substance dissoute) par rapport au volume de la solution". L'unité de mesure est la mole (ou la millimole, la micromole, etc.) par litre. Quand on utilise les unités SI, on exprime dans toute la mesure possible toutes les concentrations en concentrations de quantité de matière.

C'est cet emploi qui constitue la différence la plus importante entre les unités SI et les unités traditionnelles.

Dans le système traditionnel, on utilisait presque exclusivement la concentration massique (sans la désigner sous cette appellation relativement nouvelle). Mais celle-ci n'était pas toujours exprimée en termes de "par litre". On disait tantôt "par litre", tantôt "par 100 ml" (c'est-à-dire par 100 millilitres ou 1/10ème de litre), tantôt par "millilitre". La pratique variait selon les pays (voire selon les laboratoires d'un même pays), ce qui rendait la situation très confuse.

Pour les particules ou les entités qui ne sont pas dissoutes, on ne peut avoir recours ni à la concentration massique ni à la concentration de quantité de matière, aussi doit-on faire intervenir une nouvelle grandeur. Ainsi le sang renferme de nombreux types différents de globules. Ceux-ci y sont en suspension, et il faut donc trouver un moyen d'exprimer le nombre de globules contenus dans chaque litre de sang. Dans ce cas, le nom de la grandeur est la *concentration de nombre*, définie comme "le nombre de particules ou d'entités élémentaires présentes dans un mélange, par rapport au volume du mélange". L'unité de mesure est le *nombre par litre*.

Dans le système traditionnel, la concentration de nombre était appelée "numération" et exprimée par l'unité "nombre par millimètre cube".

Il arrive que la grandeur considérée ne soit pas le nombre effectif de globules par litre (concentration de nombre), mais la proportion de globules d'un type donné par rapport à l'ensemble — c'est-à-dire la fraction du nombre total qui correspond aux globules de ce type. Cette valeur s'appelle *fraction de nombre* et l'unité correspondante est 1 (une unité, "un"). A première vue, cela peut paraître difficile à comprendre, mais c'est en fait très simple. L'unité, ou le chiffre 1, représente l'ensemble; 0,5 correspond à la moitié, 0,2 à un cinquième, 0,25 à un quart, 0,1 à un dixième, etc. Ainsi, il existe dans le sang cinq types de leucocytes (globules blancs). La fraction de nombre de chaque type peut être: 0,45, 0,35, 0,10, 0,08 et 0,02. (Si vous additionnez ces fractions entre elles, vous constaterez que leur total est égal à 1,0 — l'unité.)

Dans le système traditionnel, cette valeur n'avait pas de nom distinct et les résultats obtenus étaient exprimés en pourcentages, et non en fractions — par exemple 50% pour une fraction de nombre de 0,5 et 8% pour une fraction de 0,08. On voit donc que la fraction de nombre correspond au pourcentage divisé par 100.

Une autre grandeur correspondant à l'unité "un" est la *fraction de volume*. Celle-ci se définit comme le volume d'un constituant d'un mélange divisé par le volume total du mélange. Ainsi, si le volume total occupé par les érythrocytes (hématies) d'1 litre (1000 ml) de sang est de 450 ml, la fraction de volume érythrocytaire est $450/1000 = 0,45$. Cette fraction de volume est importante pour le diagnostic de nombreuses maladies et doit souvent être mesurée au laboratoire.

Dans le système traditionnel, la fraction de volume n'avait pas de nom spécial, chaque fraction différente ayant une appellation différente. La fraction de volume érythrocytaire, par exemple, était dite "volume globulaire", expression ambiguë, car elle ne précisait pas de quel type de globule il s'agissait, ni que cette valeur était exprimée en pourcentage, et non en volume.

On peut déduire de ce qui précède que la fraction de nombre est un "nombre par rapport à un nombre" et la fraction de volume un "volume par rapport à un volume" — c'est-à-dire qu'il s'agit dans les deux cas de rapports. Par commodité, on décide que l'unité utilisée pour exprimer le rapport est "un".

On trouvera ci-après un tableau des noms de grandeurs nouveaux et traditionnels, ainsi que des unités SI et traditionnelles, avec leur facteurs de conversion.

UNITÉS DE VOLUME
Sous-multiples équivalents du mètre cube ou du litre

Nom	Symbole	Equivalent en mètres cubes	Nom	Symbol	Equivalent en litres	Equivalent en millilitres
décimètre cube (pas de nom)	dm^3 100 cm ³	= 0,001 m ³ = 0,0001 m ³	= litre décilitre*	1 dl	= 0,1 litre = 0,01 litre	= 1000 ml = 100 ml
(pas de nom)	10 cm ³	= 0,000 01 m ³	= centilitre*	cl	= 0,01 litre	= 10 ml
centimètre cube	cm ³	= 0,000 001 m ³	= millilitre	ml	= 0,001 litre	
millimètre cube	mm ³	= 0,000 000 001 m ³	= microlitre	μl	= 0,000 001 litre	= 0,001 ml

* Rarement utilisé en laboratoire.

NOUVEAUX NOMS DE GRANDEURS ET D'UNITÉS SI, ÉQUIVALENTS TRADITIONNELS ET FACTEURS DE CONVERSION

Nouveau nom de grandeur	Unité SI	Désignation traditionnelle	Unité traditionnelle	Facteurs de conversion et exemples*
concentration (de nombre) érythrocytaire (voir p.366)	nombre $\times 10^{12}/l$	numération érythrocytaire	millions/mm ³	pas de facteur de conversion: $4,5 \text{ millions/mm}^3 = 4,5 \times 10^{12}/l$ $5,0 \times 10^{12}/l = 5,0 \text{ millions/mm}^3$
fraction de volume érythrocytaire (voir p.379)	1	hématocrite ou volume globulaire	%	hématocrite $38\% \times 0,01 =$ fraction de volume érythrocytaire $0,38$ fraction de volume érythrocytaire $0,4 \times \frac{100}{100} =$ hématocrite 40%
concentration (de nombre) leucocytaire — sang (voir p. 360)	nombre $\times 10^9/l$	numération leucocytaire (sang)	nombre/mm ³	$8000/\text{mm}^3 \times 0,001 = 8,0 \times 10^9/l$ $7,5 \times 10^9/l \times \frac{1000}{1000} = 7500/\text{mm}^3$
concentration (de nombre) leucocytaire — liquide céphalo-rachidien (voir p. 342)	nombre $\times 10^6/l$	numération leucocytaire (liquide céphalo-rachidien)	nombre/mm ³	pas de facteur de conversion: $27/\text{mm}^3 = 27 \times 10^6/l$ $25 \times 10^6/l = 25/\text{mm}^3$
fraction de nombre (pour tel ou tel type de leucocyte, p. ex. fraction de nombre lymphocytaire) (voir p. 397, 343)	1	numération (p. ex. lymphocytaire)	%	lymphocytes $33\% \times 0,01 =$ fraction de nombre lymphocytaire $0,33$ fraction de nombre lymphocytaire $0,33 \times 100 =$ lymphocytes 33%
concentration (de nombre) réticulocytaire (voir p. 416)	nombre $\times 10^9/l$	numération réticulocytaire	nombre/mm ³	$86\,000/\text{mm}^3 \times 0,001 = 86,0 \times 10^9/l$ $91,5 \times 10^9/l \times \frac{1000}{1000} = 91\,500/\text{mm}^3$
fraction de nombre réticulocytaire ^a (voir p. 416)	10^{-3}	numération réticulocytaire	% ou °/oo	$0,50\% \times 10 = 5 \times 10^{-3}$; $12 \times 10^{-3} \times 0,1 = 1,2\%$ ou $5\text{ °/oo} = 5 \times 10^{-3}$ $12 \times 10^{-3} = 12\text{ °/oo}$
concentration (de nombre) thrombocytaire	nombre $\times 10^9/l$	numération thrombocytaire	nombre/mm ³	$220\,000/\text{mm}^3 \times 0,001 = 220 \times 10^9/l$ $250 \times 10^9/l \times \frac{1000}{1000} = 250\,000/\text{mm}^3$

* Les exemples montrent d'abord la conversion en unités SI des grandeurs exprimées en unités traditionnelles, puis l'opération inverse. Le facteur de conversion est souligné.

^a Dans ce cas, la fraction de nombre est indiquée, non pas comme une fraction de 1, mais comme une fraction de 1000, ceci pour éviter des valeurs numériques trop faibles pour être maniables.

NOUVEAUX NOMS DE GRANDEURS ET D'UNITÉS SI, ÉQUIVALENTS TRADITIONNELS ET FACTEURS DE CONVERSION

Nouveau nom de grandeur	Unité SI	Désignation traditionnelle	Unité traditionnelle	Facteurs de conversion et exemples*
glucose, concentration de quantité de matière (sang et liquide céphalo-rachidien)	mmol/l	glycémie ^b glycorachie ^b	g/l	$0,81 \text{ g/l} \times 5,55 = 4,5 \text{ mmol/l}$ $4,2 \text{ mmol/l} \times 0,1802 = 0,76 \text{ g/l}$
hémoglobine (Fe), concentration de quantité de matière	mmol/l	hémoglobine, concentration ^b	g/100 ml	Hb 13,7 g/100 ml $\times 0,621 =$ Hb (Fe) 8,5 mmol/l Hb (Fe) 9 mmol/l $\times 1,61 =$ Hb 14,5 g/100 ml
hémoglobine, concentration massique ^c	g/l	hémoglobine, concentration	g/100 ml	$14,8 \text{ g/100 ml} \times 10 = 148 \text{ g/l}$ $139 \text{ g/l} \times 0,1 = 13,9 \text{ g/100 ml}$
hémoglobine (Fe) concentration érythrocytaire moyenne de quantité de matière ^c	mmol/l	concentration globulaire moyenne	% ^d	$35\% \times 0,621 = 21,7 \text{ mmol/l}$ $22 \text{ mmol/l} \times 1,611 = 35,4\%$
hémoglobine, concentration massique érythrocytaire moyenne ^c	g/l	concentration globulaire moyenne	% ^d	$35\% \times 10 = 350 \text{ g/l}$ $298 \text{ g/l} \times 0,1 = 29,8\%$
protéines, concentration massique (liquide céphalo-rachidien)	g/l	albuminorachie ^b	g/l mg/100 ml	pas de changement $25 \text{ mg/100 ml} \times 0,01 = 0,25 \text{ g/l}$ $0,31 \text{ g/l} \times 100 = 31 \text{ mg/100 ml}$
urée, concentration sanguine de quantité de matière	mmol/l	taux d'urée sanguine ^b	g/l	$0,15 \text{ g/l} \times 16,7 = 2,5 \text{ mmol/l}$ $2,9 \text{ mmol/l} \times 0,06 = 0,17 \text{ g/l}$
		taux d'azote uréique ^e	mg/100 ml	N-ur. 7 mg/100 ml $\times 0,357 =$ urée, 2,5 mmol/l

* Les exemples montrent d'abord la conversion en unités SI des grandeurs numériques exprimées en unités traditionnelles, puis l'opération inverse. Le facteur de conversion est souligné.

^b Il s'agit de concentration massique, mais cette expression n'était pas encore en usage.

^c On trouvera les explications dans le corps du texte.

^d Il arrive qu'on exprime la concentration globulaire moyenne sous la forme d'un nombre décimal, et non en %, p.ex. 0,35 au lieu de 35%. Dans ce cas, les facteurs de conversion doivent être multipliés ou divisés par 100, comme dans les exemples suivants:

$$0,35 \times 62,1 = 21,7 \text{ mmol/l}$$

$$22 \text{ mmol/l} \times 0,01611 = 0,354$$

$$0,35 \times 1000 = 350 \text{ g/l}$$

$$298 \text{ g/l} \times 0,001 = 0,298$$

^e Dans le système traditionnel, le taux d'urée est exprimé parfois en quantité d'urée et parfois en quantité d'azote uréique. On a tenu compte ici des deux possibilités.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES GÉNÉRALES DE LABORATOIRE



1. Le microscope : Réglage et entretien

Bien des maladies qui sévissent dans les pays chauds sont des maladies transmissibles: elles sont transmises par des micro-organismes qu'on peut souvent retrouver au microscope dans les prélèvements opérés sur les malades.

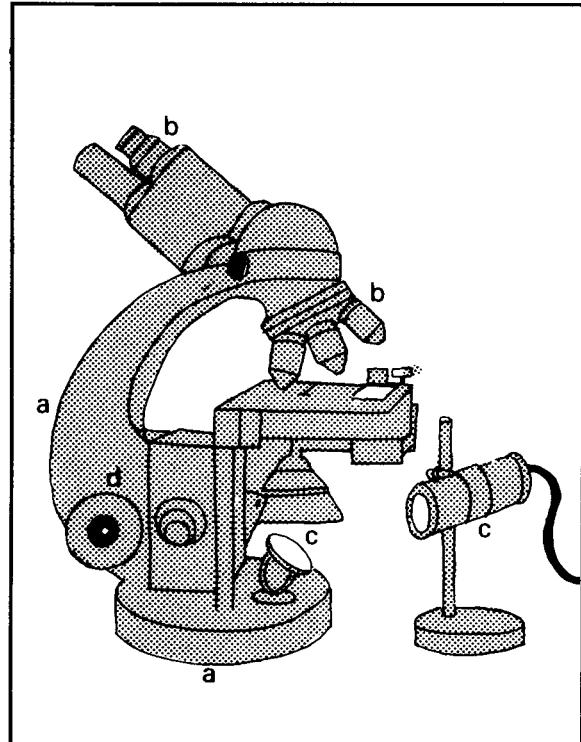
La microscopie directe est donc essentielle dans les laboratoires des pays tropicaux.

Un laboratoire médical sans microscope ou avec un microscope mal entretenu n'est plus un laboratoire digne de ce nom.

1. COMPOSITION DU MICROSCOPE

Les différentes parties du microscope peuvent être classées en 4 systèmes:

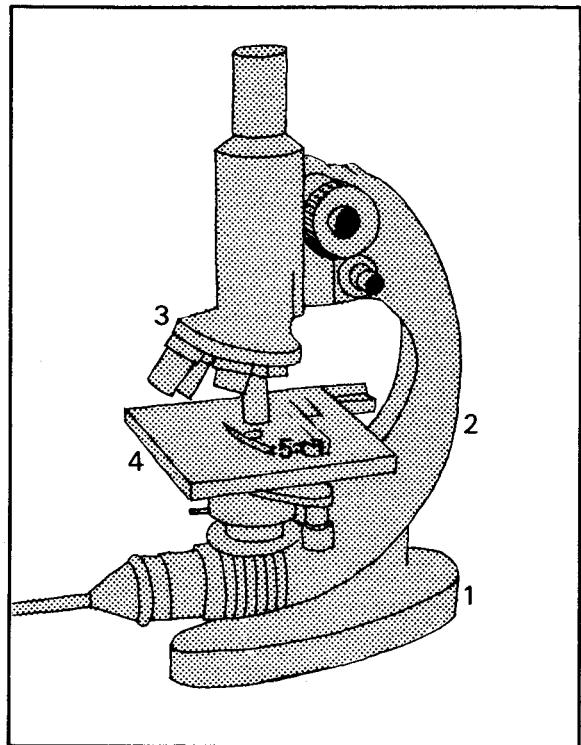
- (a) système de support
- (b) système de grossissement
- (c) système d'éclairage
- (d) système de réglage.



A. Système de support

Il comprend:

1. le pied
2. la potence
3. le revolver porte-objectif
4. la platine
5. le chariot qui permet de déplacer lentement la lame de verre avec sa préparation.

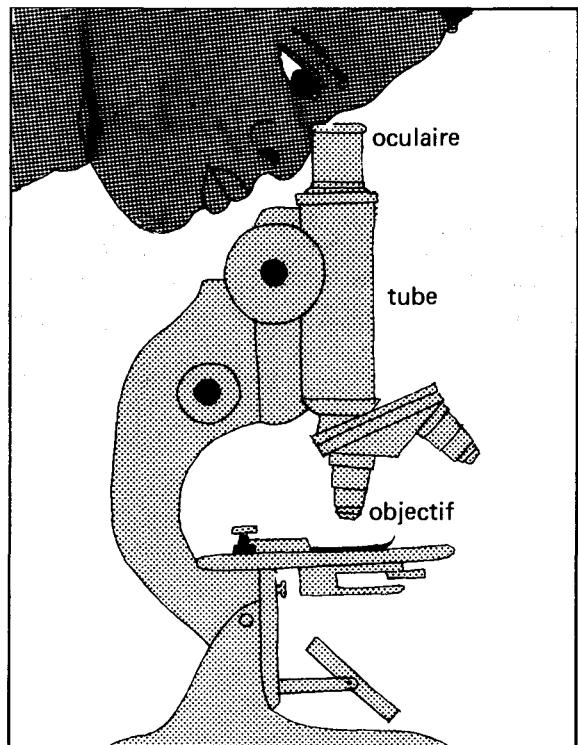


B. Système de grossissement

Il est constitué par une combinaison de lentilles.

Les lentilles du microscope sont fixées en 2 assemblages, placés chacun à l'extrémité d'un long tube.

- le 1^{er} assemblage de lentilles, situé en bas du tube, juste au-dessus de la préparation (l'*objet*) à examiner, est *l'objectif*.
- le 2^{ème} assemblage de lentilles est en haut du tube; on y place l'œil, c'est *l'oculaire*.



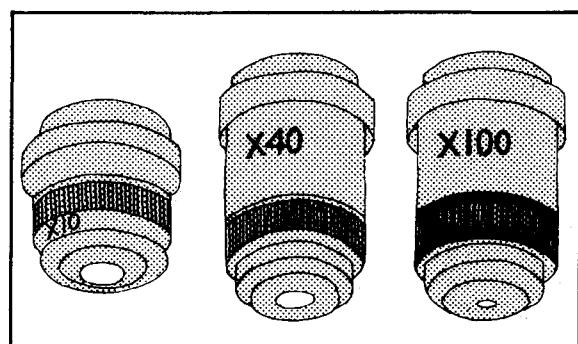
1. OBJECTIFS

(a) Grossissement

Il est indiqué, pour chaque objectif, par un chiffre gravé sur la monture:

- l'objectif 10 x grossit 10 fois
- l'objectif 40 x grossit 40 fois
- l'objectif 100 x grossit 100 fois

(L'objectif 100 est en général marqué par un cercle rouge, il s'utilise à l'immersion dans l'huile.)



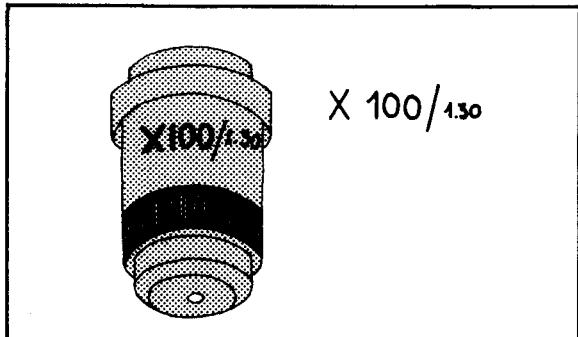
(b) No. d'ouverture numérique

C'est un autre chiffre gravé à côté du grossissement, par exemple:

- 0,30 pour un objectif 10 x
- 0,65 pour un objectif 40 x
- 1,30 pour un objectif 100 x

Plus ce chiffre est grand, plus grand est le pouvoir séparateur (qui permet de distinguer 2 points très rapprochés).

(Par ailleurs, plus ce chiffre est grand, plus petite est la lentille frontale montée à la base de l'objectif; celle de l'objectif 100 X à immersion a la grosseur d'une tête d'épingle: il faudra donc la traiter avec précaution.)

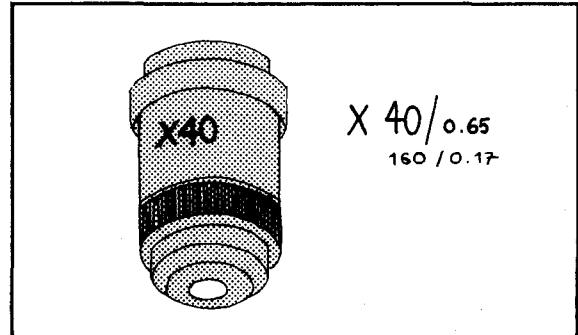


(c) D'autres chiffres peuvent être gravés sur la monture:

longueur en mm recommandée pour le tube du microscope (distance entre l'objectif et l'oculaire)
— le plus souvent 160 mm

épaisseur en mm recommandée pour la lamelle à placer sur la lame porte-objet — par exemple 0,17.

Le pas de vis de tous les objectifs est standard, c'est-à-dire que les objectifs du revolver porte-objectif sont interchangeables.

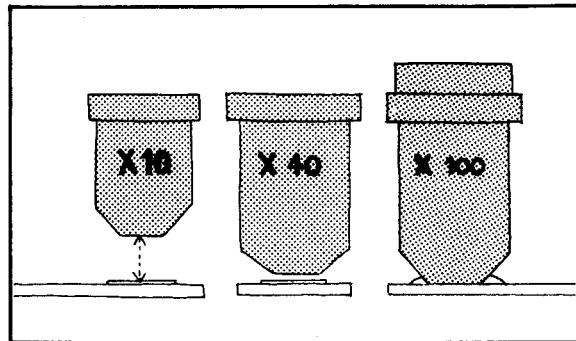


(d) Distance frontale d'un objectif

C'est la distance entre la lame et la lentille frontale de l'objectif lorsque l'image est nette.

Plus le pouvoir de grossissement augmente, plus la distance frontale diminue.

- objectif 10 x: distance frontale 5 à 6 mm
- objectif 40 x: distance frontale 0,5 à 1,5 mm
- objectif 100 x: distance frontale 0,15 à 0,20 mm

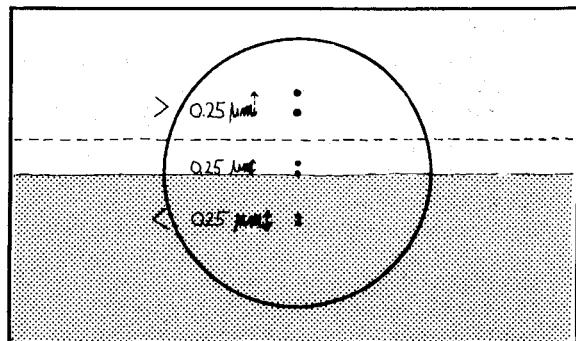


(e) Pouvoir séparateur

Plus le pouvoir séparateur de l'objectif est grand, plus l'image est nette, et mieux il permet de voir séparément et distinctement deux points très rapprochés.

Le pouvoir séparateur maximal d'un bon microscope de laboratoire médical est d'environ $0,25\mu\text{m}$, alors que le pouvoir séparateur de l'œil humain normal est de 0,25 mm.

L'huile à immersion augmente le pouvoir séparateur en empêchant les pertes de lumière dues à la diffraction que l'on constate avec les objectifs à sec.



2. OCULAIRE

Grossissement

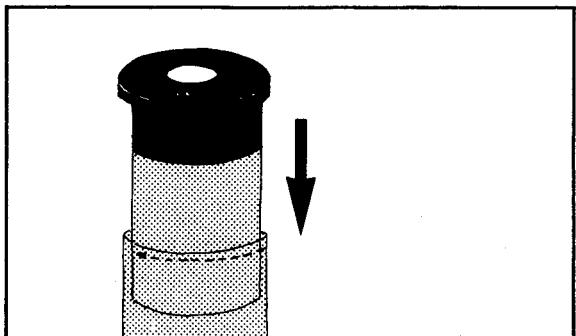
Le grossissement est indiqué sur l'oculaire.

- un oculaire 4 x grossit 4 fois l'image produite par l'objectif
- un oculaire 6 x grossit 6 fois
- un oculaire 10 x grossit 10 fois.

Si l'objet est grossi 40 fois par l'objectif 40 x puis 6 fois par l'objectif 6 x, il est finalement grossi de $6 \times 40 = 240$ fois.

Pour connaître le grossissement de l'objet observé, il suffit donc de multiplier les valeurs de grossissement de l'objectif et de l'oculaire.

Les microscopes utilisés au laboratoire médical grossissent de 50 à 1000 fois.



Microscopes monoculaire ou binoculaire

Les microscopes monoculaires (1 seul oculaire) sont plus lumineux, ils sont recommandés pour l'utilisation des objectifs 100 x à immersion avec, comme éclairage, la lumière du jour.

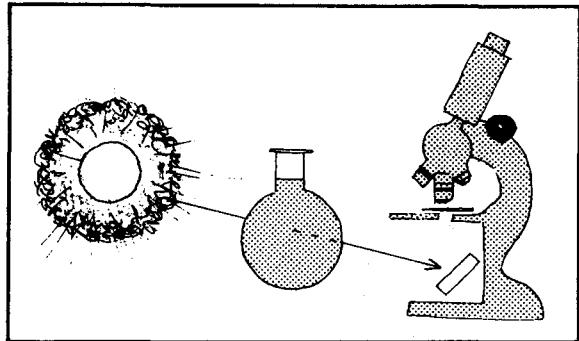
Les microscopes binoculaires (possédant 2 oculaires mais n'utilisant qu'un seul objectif à la fois) permettent des examens prolongés sans fatiguer la vue. Mais un éclairage électrique devient alors indispensable pour utiliser l'objectif 100 x.

C. Système d'éclairage

1. Source lumineuse

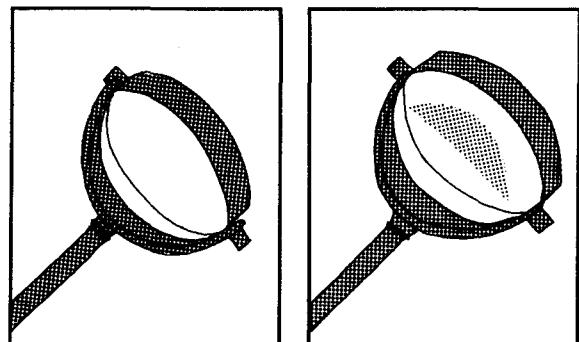
De préférence la lumière électrique qui permet un réglage plus facile. Elle est fournie par une lampe incorporée à l'intérieur du microscope, au-dessous de la platine, ou par une lampe extérieure, placée devant le microscope.

Sinon, la lumière du jour. Le microscope ne doit jamais être utilisé ni placé directement à la lumière du jour. Il doit être bien éclairé mais employé sous une source de lumière tamisée. Si le soleil est vif, on peut le placer derrière une bouteille, ou un ballon rempli d'eau qui atténuerait l'éclairage.



2. Miroir

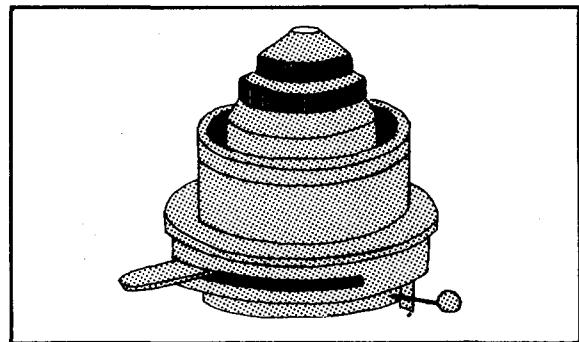
Le miroir sert à renvoyer la lumière sur la préparation à examiner. Il a une face plane et une face concave. Cette dernière constitue un condenseur de faible puissance et ne doit donc pas être utilisé si l'appareil possède un condenseur.



3. Condenseur

Il sert à concentrer les rayons de la lumière et à la diriger sur la préparation à examiner.

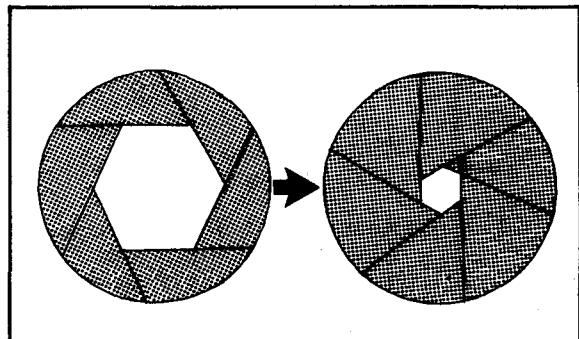
Il est donc situé entre le miroir et la platine. On peut le monter (éclairage maximal) ou l'abaisser (éclairage minimal). Il doit être centré et réglé correctement.



4. Diaphragme

Il est placé dans le condenseur; il sert à en diminuer ou à en augmenter l'angle, et, par conséquent, à modifier la quantité de lumière qui passe dans le condenseur.

Plus le diaphragme est large, plus l'angle est ouvert, plus grand est le numéro d'ouverture numérique, et plus les détails perçus sont petits, mais moins l'image est contrastée.



5. *Filtres*

Certains microscopes comportent, au-dessous du condenseur, des filtres colorés (notamment des filtres bleus) qui peuvent être laissés ou retirés selon le type de préparation examinée.

D. Système de réglage

Il comprend:

1. *La vis de mise au point rapide*

C'est la vis la plus grande. On l'utilise en premier pour obtenir un réglage approximatif.

2. *La vis micrométrique (mise au point fine)*

Avec un mouvement beaucoup plus lent elle permet de parfaire la netteté.

3. *La vis de montée/descente du condenseur*

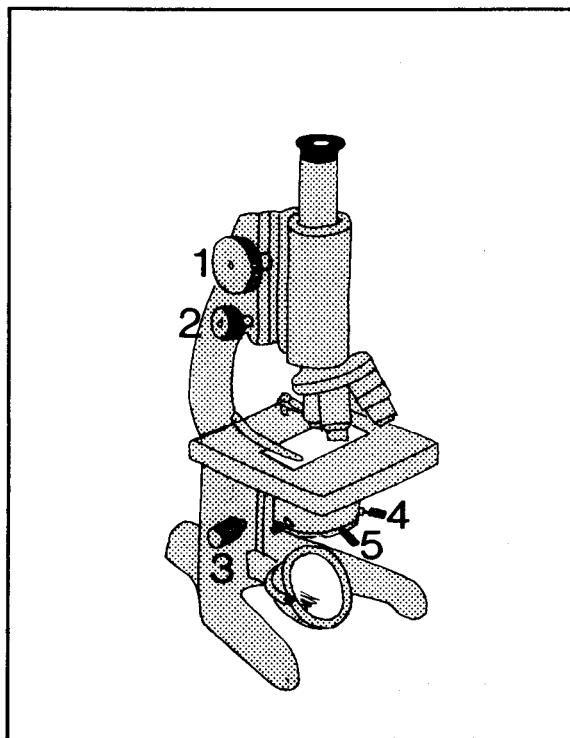
Elle permet de monter le condenseur pour augmenter l'intensité de l'éclairage ou de l'abaisser pour la diminuer.

4. *Les vis de centrage du condenseur*

Le microscope peut comporter 3 vis disposées autour du condenseur: une de front, une à droite, une à gauche; elles servent à centrer exactement le condenseur par rapport à l'objectif.

5. *La barrette du diaphragme*

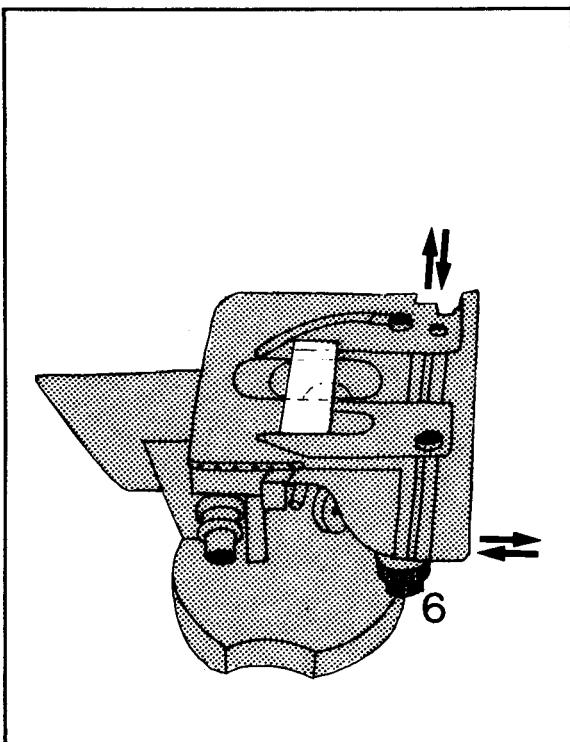
C'est une petite tige fixée sur le condenseur; on la tire pour fermer ou ouvrir le diaphragme et augmenter ou diminuer ainsi à la fois l'angle et l'intensité de l'éclairage.



6. *Les vis du chariot*

Elles servent à déplacer la lame porte-objet sur la platine:

1 vis pour la déplacer d'avant en arrière,
1 vis pour la déplacer de gauche à droite.



II. INSTALLATION D'UN MICROSCOPE

Quand le laboratoire reçoit un nouveau microscope, il importe de savoir l'installer.

1. Emplacement du microscope

Sur une table solide — plane (vérifier au niveau d'eau) — pas trop haute, suffisamment grande. Si l'éclairage est électrique, placer le microscope à l'ombre, loin d'une fenêtre. Mettre dessous un carré de feutre, ou, à défaut, un morceau de tissu épais.

2. Montage des accessoires

- Visser les objectifs sur le revolver porte-objectif, en suivant le sens des aiguilles d'une montre, dans l'ordre suivant:
 - (objectif 3 ou 5 x)
 - objectif 10 x
 - objectif 40 x
 - objectif 100 x (à immersion).

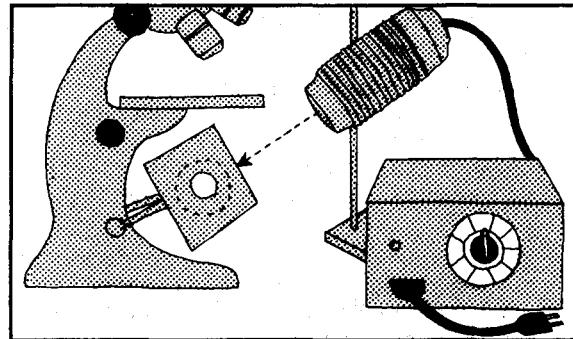
Les pas de vis sont standard.

- Placer l'oculaire (ou les 2 oculaires).
- Fixer le condenseur au-dessous de la platine.
- Fixer le miroir à la base du pied.

3. Position de la lampe d'éclairage

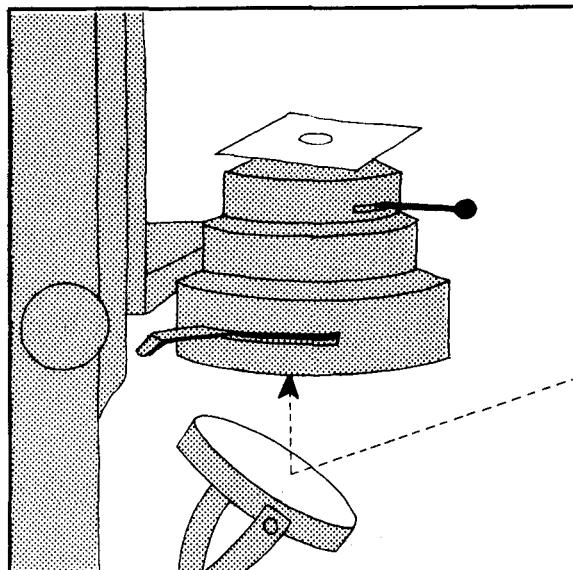
Si l'éclairage est électrique, placer la lampe à 20 cm en avant du microscope, face au miroir incliné à 45°. Mettre sur le miroir un carré de papier. Fixer la position de la lampe, de telle manière que le rayon lumineux tombe au centre du miroir.

Si la lampe est munie d'une lentille on peut observer les filaments de l'ampoule sur la feuille de papier placée sur le miroir — ce qui permet un centrage plus rigoureux du rayon lumineux. Pour certaines lampes, il faut tourner l'ampoule électrique jusqu'à l'obtention d'une image nette du filament.

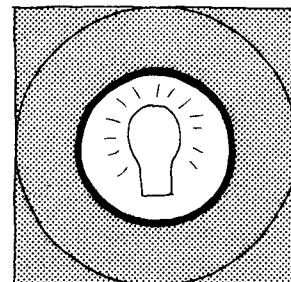


4. Réglage préalable du miroir

Utiliser la face plane du miroir. Retirer les filtres colorés. Ouvrir le diaphragme au maximum. Monter le condenseur. Poser un carré de papier blanc mince sur la lentille fixée au sommet du condenseur. On doit distinguer dans ce carré de papier l'image de la lampe électrique entourée d'un cercle lumineux.



Fixer la position du miroir de telle manière que l'image de l'ampoule se trouve exactement au centre du cercle lumineux (ou, si l'on travaille à la lumière du jour, à l'endroit le plus éclairé).

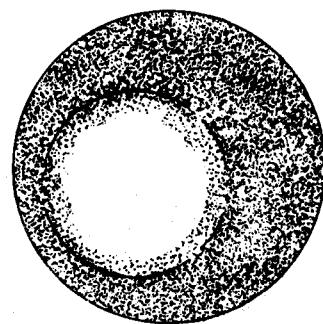


5. Réglage du condenseur

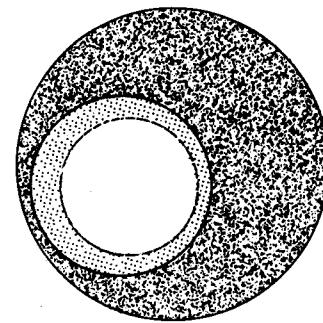
Si l'on dispose d'un modèle réglable, ce réglage très important ne doit pas être oublié. Il est trop souvent négligé.

- (a) Placer une lame avec une préparation sans lamelle sur la platine. Abaisser le condenseur. Ouvrir le diaphragme. Examiner avec l'objectif à plus faible grossissement (3, 5 ou 10 x). Regarder dans l'oculaire et mettre au point.

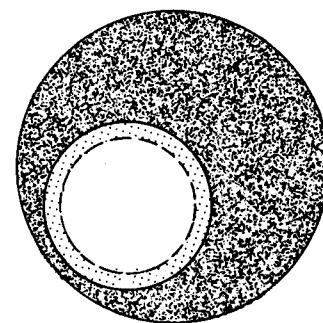
- (b) Fermer le diaphragme. On voit dans le champ un disque lumineux flou entouré d'un anneau sombre.

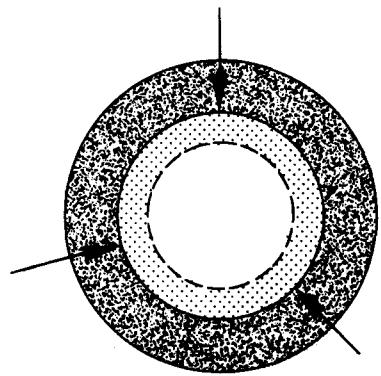


- (c) Monter lentement le condenseur jusqu'à ce que les bords de ce disque lumineux soient bien nets.

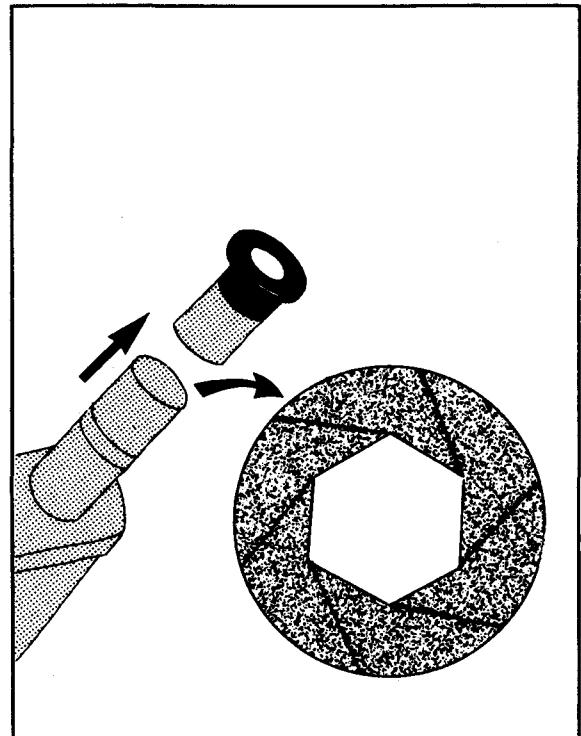


- (d) Le cas échéant, modifier légèrement la position du miroir pour que le disque de lumière se trouve exactement au centre du cercle clair dessiné par la zone d'ombre ou superposé à celui-ci.





- (e) A l'aide des vis de centrage du condenseur, centrer exactement le cercle lumineux au milieu du champ. Répéter l'opération avec les autres objectifs.



6. *Réglage du diaphragme*

Ouvrir complètement le diaphragme. Retirer l'oculaire, regarder dans le fond du tube où l'on aperçoit la lentille supérieure de l'objectif, remplie par un disque de lumière. Fermer doucement le diaphragme jusqu'à ce que le disque de lumière n'occupe plus que les 2/3 de la surface.

Répéter l'opération à chaque changement d'objectif.

7. *Réglage des oculaires*

Choix de l'oculaire

Au laboratoire médical, les oculaires 5 et 6 x donnent de bons résultats. En utilisant des oculaires plus puissants, on augmente le grossissement de l'ensemble, sans pour autant mieux distinguer les détails. Le choix de l'oculaire est une question de préférence personnelle.

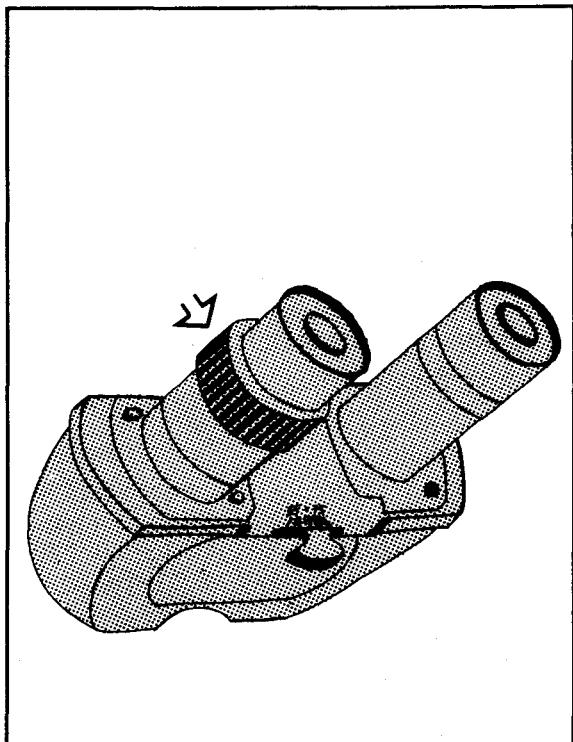
Ecart des binoculaires

Sur les microscopes binoculaires, chacun peut adapter l'écart entre les deux oculaires en fonction de la distance entre les yeux.

Mise au point entre l'œil droit et l'œil gauche

Un des 2 tubes porte-oculaires comporte une bague de réglage (le gauche généralement). Dans ce cas, fermer l'œil gauche et mettre au point pour l'œil droit dans l'oculaire droit (utiliser l'objectif 40 x).

Puis, fermer l'œil droit, regarder dans l'oculaire gauche. Si l'image est nette, aucun réglage n'est nécessaire. Si l'image n'est pas nette, tourner la bague de réglage de l'oculaire jusqu'à la netteté maximale. Le microscope se trouve ainsi adapté à votre propre vision binoculaire.



III. MISE AU POINT DES IMAGES

1 Objectif à faible grossissement (5 ou 10 x)

Abaissier le condenseur à fond.

Abaissier l'objectif juste au-dessus de la préparation.

Remonter l'objectif avec la vis rapide jusqu'à ce que l'on obtienne dans l'oculaire une image nette.

Quelquefois, bien que l'objectif ait été abaissé le plus bas possible, jusqu'à sa butée, on ne parvient pas à voir une image nette. C'est que la vis micrométrique est à bout de course. Il suffit alors de la faire tourner jusqu'à l'autre bout de course et de procéder à nouveau à la mise au point en remontant l'objectif.

Remonter un peu le condenseur si l'éclairage est insuffisant.

2. Objectif à fort grossissement (40 x)

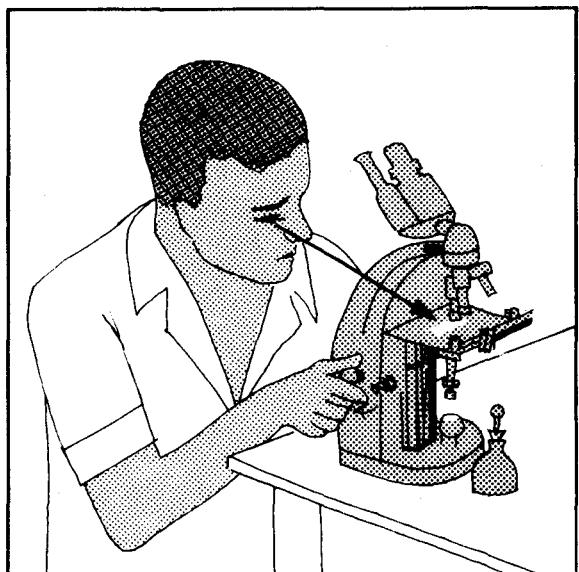
Placer le condenseur à mi-course.

Abaissier l'objectif juste au-dessus de la préparation (la distance frontale est très courte — environ 0,5 mm).

Avec la vis rapide remonter l'objectif très lentement jusqu'à apercevoir l'image floue du champ microscopique.

Parfaire la mise au point avec la vis micrométrique. Remonter le condenseur jusqu'à obtenir un éclairage suffisant.

Si le microscope n'a pas de condenseur, utiliser la face concave du miroir.

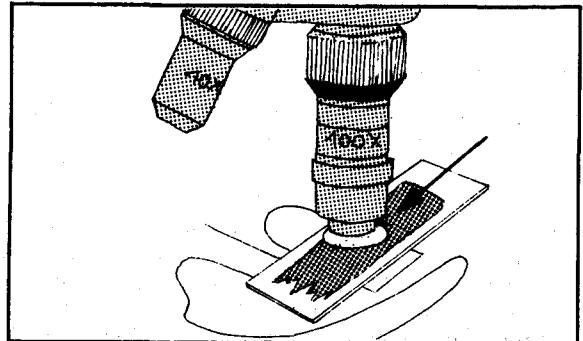


3. Objectif à immersion (110 x)

Utiliser des lames colorées parfaitement sèches.

Placer une petite goutte d'huile à immersion sur la partie à examiner (utiliser des huiles synthétiques qui ne sèchent pas, plutôt que de l'huile de cèdre qui sèche vite).

Remonter le condenseur à fond et ouvrir le diaphragme au maximum. Abaisser l'objectif 100 x pour le mettre en contact avec l'huile, le plus près possible de la lame sans toutefois l'écraser (les objectifs modernes sont dotés d'un amortisseur).



Regarder dans l'oculaire, faire varier, très lentement, la vis micrométrique jusqu'à voir l'image nette.

Si l'éclairage n'est pas suffisant, procéder comme indiqué pour l'objectif 40 x avec le côté concave du miroir.

Attention: Aujourd'hui, dans la plupart des microscopes, ce n'est pas le tube porte-objectif qui est mobile, mais la platine qui dépend des vis de réglage rapide et micrométrique. Le mouvement des vis est alors inversé pour les mises au point.

Profondeur de champ

L'image est vue avec sa profondeur quand on utilise un objectif à faible grossissement. La profondeur du champ vu avec netteté est moins grande lorsqu'on utilise des objectifs puissants (40 x, 100 x), ce qui accroît l'impression globale de relief, et il faut faire varier la vis micrométrique pour voir tous les détails dans la troisième dimension (par exemple les différents noyaux à l'intérieur d'un kyste sphérique d'amibe).

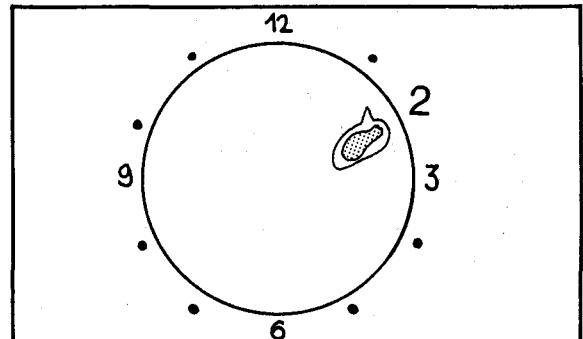
4. Images vues au microscope

Rappelons que le disque de lumière vu dans l'oculaire est appelé "le champ microscopique".

Comment situer les objets

On peut situer les objets dans le champ par rapport à un cadran de montre.

Par exemple, ici, l'oeuf de schistosome est à "2 heures".



Inversion des images

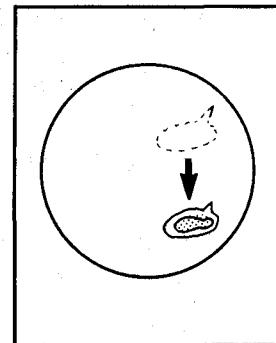
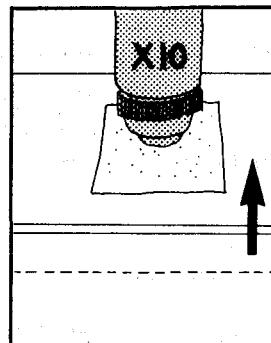
Les images vues sont inversées à cause des lentilles:

- les objets vus en bas du champ sont, en fait, en haut
- les objets vus à droite du champ sont, en fait, à gauche.

Déplacement des objets

Si on déplace la lame vers la droite, l'objet examiné va vers la gauche.

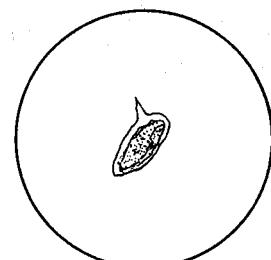
Si on déplace la lame vers l'avant, l'objet examiné va vers l'arrière.



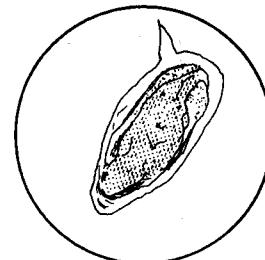
Changement d'objectifs

Les microscopes modernes sont conçus de telle manière que, lorsqu'on passe d'un objectif moins puissant à un objectif plus puissant pour observer le même objet, la netteté de l'image reste à peu près bonne. Si ce n'est pas le cas, remonter le tube porte-objectif avant de passer à un objectif plus puissant, puis remettre au point.

Pour garder un objet dans le champ lorsqu'on change d'objectif, il faut le placer bien au centre du champ microscopique.



X 10



X 40

IV. ENTRETIEN DU MICROSCOPE

Cet entretien doit être quotidien, car c'est de lui que dépend le maintien en bon état du microscope et donc la qualité des examens de laboratoire. Dans les pays chauds et humides, il exige des soins particulièrement assidus.

1. Matériel nécessaire

1. Des morceaux de tissu usagé et un mouchoir fin et doux, déjà lavé
2. Du papier spécial pour nettoyage des lentilles ou, à défaut, du papier absorbant blanc (papier hygiénique)
3. Une peau de chamois, si possible (sinon un chiffon non pelucheux)
4. Un petit flacon de xylène (ou de toluène)
5. Une housse en plastique
6. Une petite poire en caoutchouc et, si possible, un pinceau à poils fins (ou un pinceau spécial pour nettoyage des lentilles)
7. Dans les régions chaudes et humides —
Laboratoires équipés à l'électricité:
— une armoire chauffante avec 1 ou 2 ampoules de 40 watts
Laboratoires sans électricité:
— si possible un dessicateur de 15 à 20 cm de diamètre contenant au moins 250 g de gel de silice bleu (qui indique l'humidité en virant au rose).

2. Nettoyage des objectifs

Objectifs à sec

Souffler sur la lentille et l'essuyer avec un linge doux, d'un mouvement transversal, et non circulaire.

Objectifs à immersion

Essuyer l'huile avec du papier à lentille (ou absorbant). S'il s'agit de traces anciennes d'huile synthétique ou d'huile de cèdre, utiliser d'abord un papier très légèrement imbiber de xylène (ou de toluène), puis essuyer de nouveau avec un papier sec.

Tous les soirs, avant de ranger le microscope, enlever la poussière des objectifs en insufflant un jet d'air à l'aide de la poire en caoutchouc et parfaire éventuellement le nettoyage à l'aide du pinceau fin.

3. Nettoyage des oculaires

- Nettoyer la face supérieure de la lentille supérieure (où l'on place l'œil) au moyen d'un linge doux ou de papier absorbant
- Nettoyer au pinceau fin la face inférieure de la lentille inférieure, à l'intérieur du tube
- S'il y a de la poussière à l'intérieur de l'oculaire, dévisser la lentille supérieure et nettoyer les lentilles internes en utilisant uniquement un jet d'air de la poire et le pinceau fin.

4. Nettoyage du condenseur et du miroir

Le condenseur est nettoyé, comme les objectifs, avec un linge fin ou un mouchoir en papier imbibé de xylène.

Le miroir est nettoyé avec un linge fin imbibé d'alcool.

5. Nettoyage du support et de la platine

Nettoyer à la peau de chamois ou, à défaut, avec un linge doux non pelucheux.

Ne jamais utiliser de xylène, qui peut attaquer le vernis noir du microscope.

La platine peut être nettoyée à fond avec un papier absorbant imprégné de vaseline.

V. PRÉCAUTIONS SUPPLÉMENTAIRES À PRENDRE DANS LES PAYS CHAUDS

A. Climats chauds et humides

Dans ces pays, si aucune précaution n'est prise, des champignons risquent de se développer sur le microscope, surtout à la surface des lentilles, dans les rainures des vis, sous le vernis, rendant vite l'appareil inutilisable. Que faire?

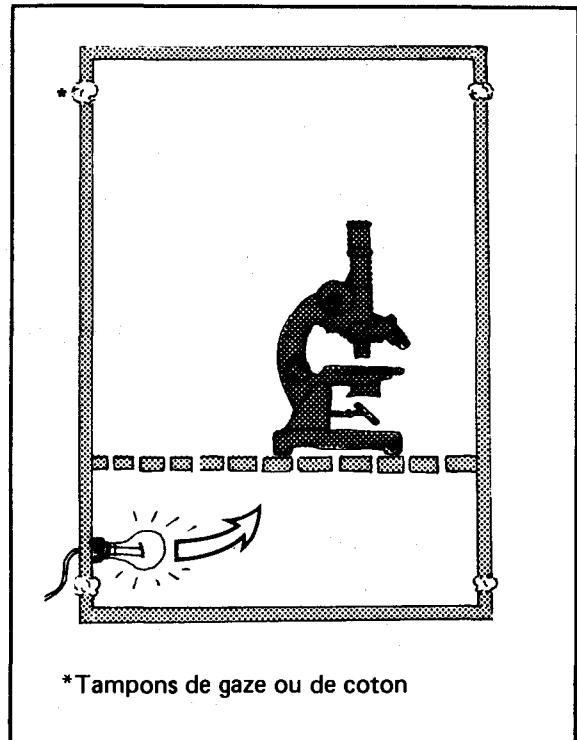
1. Laboratoire équipé à l'électricité

Le microscope sera placé chaque soir dans une armoire chauffante, simple placard bien fermé avec 1 ou 2 ampoules électriques de 40 watts (pour un placard juste assez grand pour contenir 1 à 4 microscopes, une ampoule suffit). Elle doit rester constamment allumée, même quand le microscope n'est pas dans l'armoire.

S'assurer que la température à l'intérieur du placard est au moins supérieure de 5° à celle du laboratoire. Par exemple:

- température du laboratoire: 26°C
- température dans l'armoire chauffante: 32°C.

Attention: même si le laboratoire est climatisé il faut ranger les microscopes dans l'armoire chauffante.

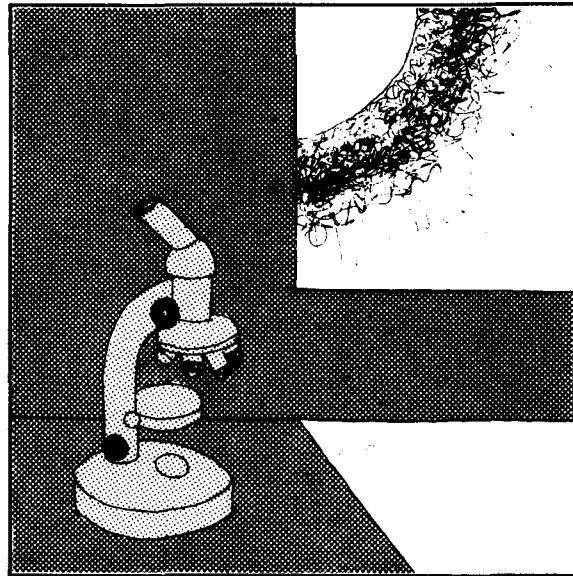


* Tampons de gaze ou de coton

Il est recommandé de faire faire une inspection et un nettoyage régulier par un spécialiste.

2. Laboratoires sans électricité

Le microscope peut rester à l'air libre, à l'ombre, mais près d'un emplacement ensoleillé. Ne jamais l'enfermer dans sa boîte en bois (même pour la nuit), mais toujours le recouvrir de sa housse. Par contre, il faudra le nettoyer quotidiennement pour le débarrasser de la poussière.



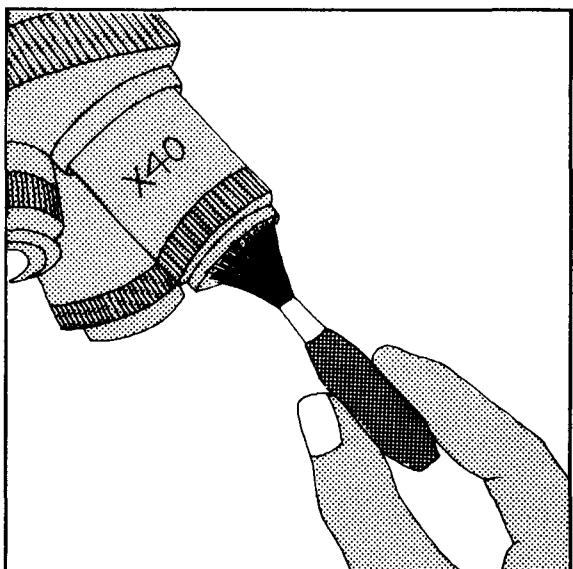
L'idéal serait de faire venir au laboratoire tous les trois mois un spécialiste qui démonterait le microscope et qui se chargerait:

- d'inspecter toutes les surfaces des lentilles et du prisme, pour y déceler dès le début la présence de champignons
- de lubrifier les parties métalliques avec une huile détergente spéciale.

B. Climat chaud et sec

Dans ces pays, c'est la poussière qui est le plus à craindre (tempêtes de sable, etc.). Elle peut s'infiltrer dans les pas de vis ou sous les lentilles. Que faire?

1. Dès qu'il n'est plus utilisé, ranger le microscope sous une housse hermétique en plastique. Le remettre chaque soir dans sa boîte en bois.
2. A la fin de chaque journée de travail, le nettoyer complètement au jet d'air avec la poire en caoutchouc.
3. Compléter le nettoyage des lentilles avec un pinceau fin ou un pinceau spécial pour lentilles. S'il reste de la poussière à la surface des objectifs, l'enlever avec le papier spécial.
4. Si la saison humide dure plus d'un mois, prendre pendant cette période les précautions indiquées ci-dessus pour les pays chauds et humides.



ATTENTION

1. Ne jamais nettoyer à l'alcool les lentilles des objectifs et oculaires.
 2. Ne jamais faire tremper les objectifs dans le xylène ou l'alcool (les lentilles se décolleraient).
 3. Ne jamais utiliser du papier ordinaire ou de l'ouate pour nettoyer les lentilles.
 4. Ne jamais poser les doigts sur les objectifs.
 5. Ne jamais nettoyer au xylène le support ou la platine.
 6. Ne jamais nettoyer les lentilles *intérieures* de l'oculaire et des objectifs avec un chiffon ou un papier (on risquerait d'en enlever la couche anti-reflet). Utiliser exclusivement un pinceau fin.
 7. Ne jamais laisser le microscope sans ses oculaires si leurs orifices ne sont pas bouchés.
 8. Ne jamais ranger le microscope dans sa boîte en bois, fermée, dans les pays chauds et humides.
 9. Ne jamais ranger le microscope avec de l'huile à immersion sur l'objectif.
 10. Ne jamais soulever le microscope d'une main par la potence; utiliser les deux mains en en plaçant une sous le pied de l'appareil et l'autre autour de la potence.
-

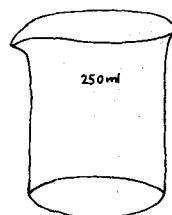
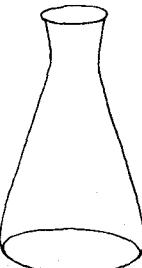
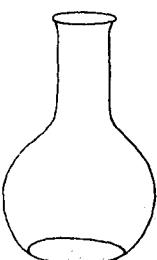
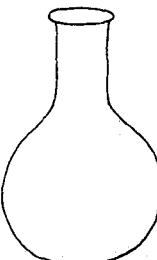
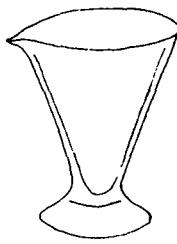
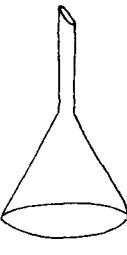
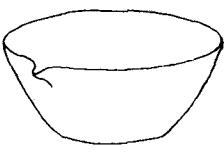
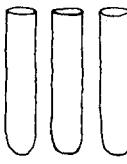
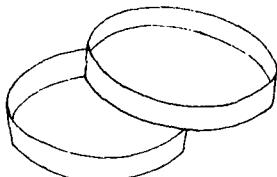
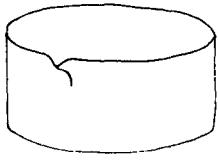
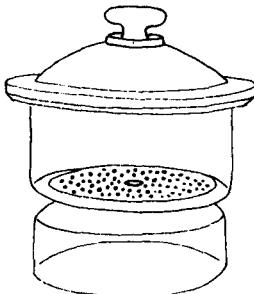
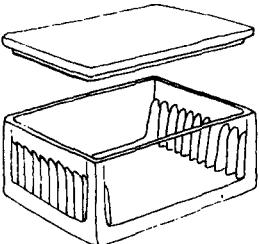
MICROSCOPE DE McARTHUR

Il s'agit d'un instrument qui, tout en permettant des grossissements maxima, n'est pas plus encombrant qu'un appareil de photo, et pèse moins d'une livre.

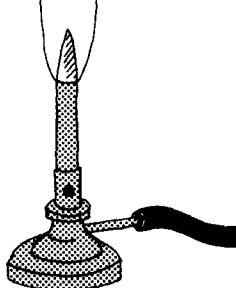
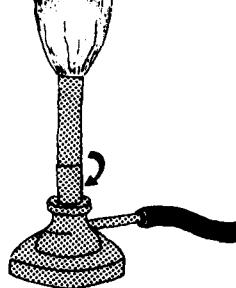
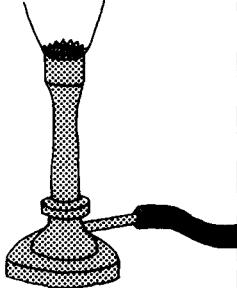
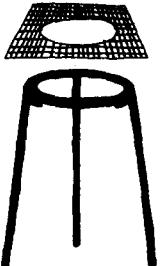
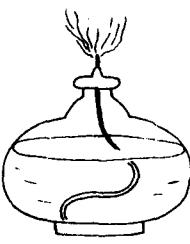
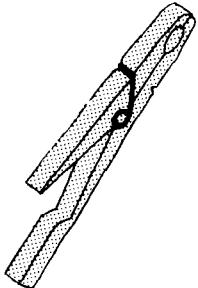
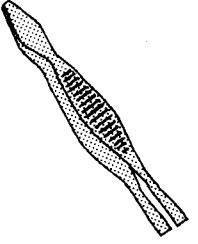
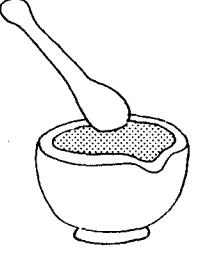
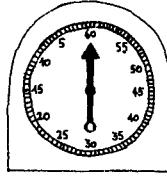
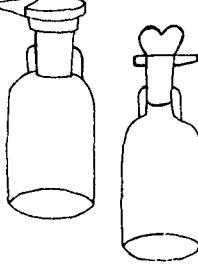
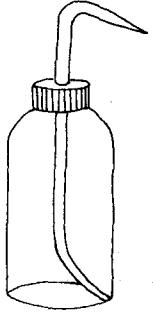
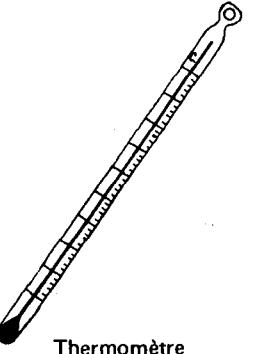
Il est employé dans les pays en voie de développement pour diverses activités: examen de lames de sang et de dissections de moustiques lors d'enquêtes paludologiques en milieu rural; dépistage de porteurs de la maladie du sommeil par examen du sang et du liquide céphalo-rachidien; recherche d'œufs de parasites dans les urines et les selles; examen des crachats pour le dépistage de la tuberculose et dissection de mollusques dans la lutte contre la schistosomiase.

L'instrument se règle automatiquement et donne une image directe, non inversée. Il est robuste, doté d'une gamme d'accessoires, y compris le matériel pour l'immersion, l'utilisation de fonds noirs et le contraste de phases. Il peut être employé pour examiner des sédiments, pour des numérations hématologiques et pour d'autres activités entreprises dans le cadre d'enquêtes rurales.

2. Récipients et petit matériel de laboratoire

			
Bécher	Erlenmeyer	Ballon à fond plat	Ballon à fond rond
			
Verre à pied	Entonnoir	Capsule de porcelaine	Verre de montre
			
Tube à essai	Tubes à hémolyse	Tube à centrifuger (fond rond)	Tube à centrifuger (fond conique)
			
Boîte de Pétri	Cristallisoir	Dessicateur	Cuve à coloration

Pour le matériel de volumétrie: pipettes, éprouvettes, fioles jaugées, voir page 42.

			
Bec Bunsen (flamme chauffante)	Bec Bunsen (flamme éclairante)	Bec Meker	Plaque d'amiante Trépied
			
Lampe à alcool	Pince en bois pour tubes	Pince pour lames de verre	Pilon Mortier
			
Minuterie	Flacons compte-gouttes	Pissette	Thermomètre

3. Nettoyage de la verrerie

TECHNIQUES UTILISÉES POUR NETTOYER

1. les récipients en verre (erlenmeyers, béchers, tubes)
2. les pipettes
3. les lames pour examen microscopique
4. le petit matériel (seringues, aiguilles, etc.).

I. RÉCIPIENTS EN VERRE

A. Verrerie neuve

La verrerie qui n'a jamais servi est légèrement alcaline.

Pour neutraliser cette alcalinité:

- préparer une bassine contenant trois litres d'eau additionnée de 60 ml d'acide chlorhydrique concentré (soit une solution d'acide à 2%)
- y faire tremper pendant 24 heures la verrerie neuve complètement immergée
- rincer deux fois à l'eau ordinaire et une fois à l'eau déminéralisée
- sécher.

B. Verrerie sale

1. *Destruction des récipients ayant contenu des échantillons (voir page 40)*

2. Rinçage préalable

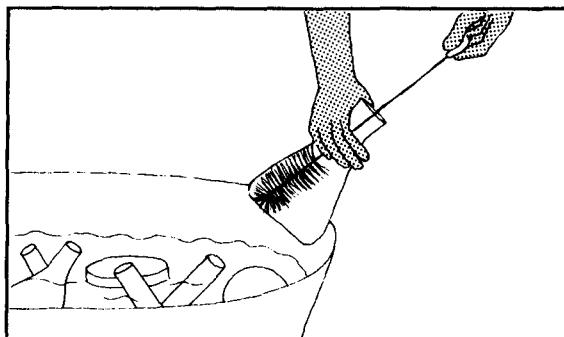
Faire deux rinçages à l'eau froide ou tiède (ne jamais rincer à l'eau chaude les tubes salis par du sang).

La verrerie ayant servi pour des liquides contenant des protéines ne doit être mise à sécher qu'après avoir été rincée et lavée.

3. Trempage dans une solution détergente

Préparer une bassine d'eau additionnée de lessive ou de détergent liquide. Faire tremper la verrerie et en brosser l'intérieur à la brosse-écouillon.

Laisser tremper deux à trois heures.



4. Rinçage

Prendre, un à un, chaque récipient. Le rincer longuement sous le robinet, puis l'immerger pendant 30 minutes dans une bassine d'eau ordinaire. Rincer à l'eau claire courante, toujours un par un. (Ne pas oublier que des traces résiduelles de lessive sur la verrerie risquent de fausser les résultats des examens et des épreuves).

5. Egouttage

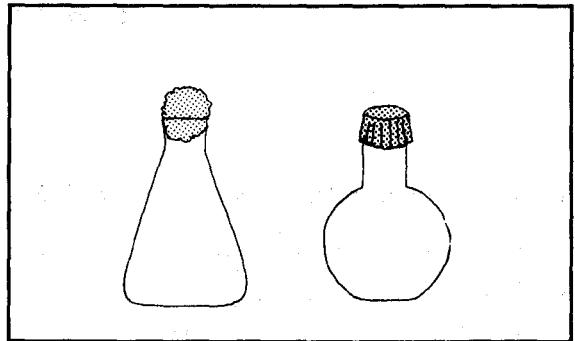
Placer les récipients (béchers, erlenmeyers, ballons, éprouvettes) sur les pignons d'un égouttoir mural. Placer les tubes retournés dans un panier métallique.

6. Séchage

Faire sécher dans des paniers métalliques au four Pasteur à 60°C. Sinon, placer les paniers à sécher dans un endroit ensoleillé du laboratoire en les couvrant d'un linge fin.

7. Bouchage

Dès qu'elle est sèche, la verrerie propre sera rangée dans une armoire, à l'abri de la poussière. Il est recommandé de boucher les récipients avec du coton cardé, avec un petit capuchon confectionné en papier journal, ou, mieux encore, avec une mince couche de paraffine ou de plastique (Parafilm ou Saran).



II. PIPETTES

1. Rinçage immédiat

Dès qu'une pipette a servi, il faut la rincer sous un jet d'eau froide pour en enlever le sang, l'urine, le sérum, les réactifs, etc.

2. Trempage dans l'eau

Après rinçage, placer les pipettes dans une grande éprouvette en plastique (ou dans une bassine) remplie d'eau. Si les pipettes ont servi à mesurer un liquide contaminé, les faire tremper pendant 24 heures dans une éprouvette remplie d'une solution désinfectante (sel d'ammonium quaternaire ou phénol à 2%).

3. Trempage dans une solution détergente et rinçage

Procéder comme indiqué ci-dessus pour la verrerie.

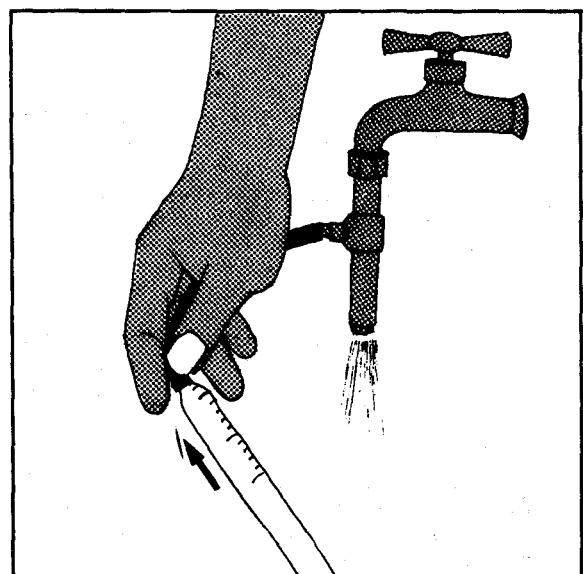
4. Pipettes bouchées

- Les placer dans une éprouvette remplie de mélange sulfo-chromique (réactif No. 51) en les y faisant glisser avec précaution et laisser tremper 24 heures.
- Le lendemain, vider la solution dans une autre éprouvette (elle peut resservir quatre fois).
- Rincer à fond l'éprouvette contenant les pipettes sous le jet du robinet.
- Sortir les pipettes une à une. Vérifier qu'elles sont débouchées sous le jet du robinet. Les rincer à nouveau.
- Les laisser tremper pendant 30 minutes dans de l'eau ordinaire, puis dans de l'eau déminéralisée 30 minutes de plus.

Attention: Cette solution est extrêmement corrosive et doit être employée avec les précautions d'usage. Si elle éclabousse accidentellement les yeux, la peau ou les vêtements, rincer immédiatement à grande eau.

5. Séchage

Faire sécher les pipettes en Pyrex au four Pasteur à 60°C et celles en verre ordinaire à l'étuve à 37°C ou à l'air.



6. Utilisation de la trompe à vide

Il s'agit d'un petit appareil en métal (ou en verre; il est alors très fragile) qu'on fixe au robinet.

- Faire couler l'eau à forte pression dans la trompe. De l'air est aspiré par la tubulure latérale.
- Adapter la pointe de la pipette au tube de caoutchouc souple de la tubulure latérale.
- Plonger l'autre extrémité de la pipette dans le liquide de rinçage qui monte immédiatement dans la pipette, la traverse, et est rejeté par la trompe dans l'évier.

III. LAMES POUR EXAMEN MICROSCOPIQUE

A. Lames neuves

1. *Trempage dans une solution détergente*

Préparer une bassine d'eau additionnée de poudre à lessive ou de détergent liquide, dans les proportions recommandées par le fabricant. Y déposer les lames une à une et les laisser tremper toute la nuit.

2. *Rinçage à l'eau*

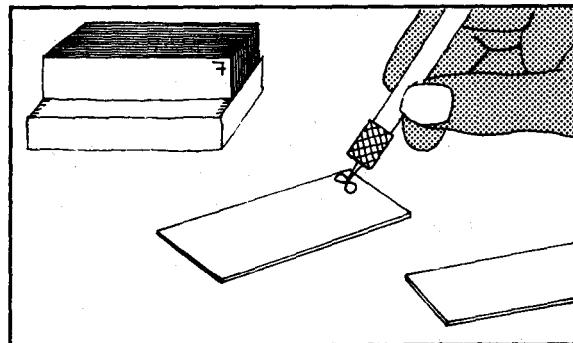
Rincer les lames à l'eau du robinet, puis les laisser tremper 15 minutes dans de l'eau claire.

3. *Essuyage et séchage*

Essuyer les lames une à une avec un linge doux non pelucheux. Les placer, toujours une par une, sur une feuille de papier filtre. Les laisser sécher. Les examiner l'une après l'autre. Eliminer les lames sales, rayées, jaunies, et celles qui présentent des taches opaques.

4. *Empaquetage*

Grouper les lames par 10 ou 20 et les emballer dans de petites feuilles de papier.



5. *Numérotation*

Dans certains laboratoires, on numérote à l'avance les lames, au crayon-diamant, de 1 à 100, et on les répartit en 5 paquets (1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100).

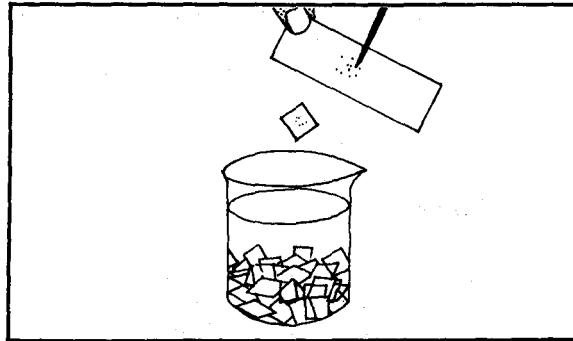
B. Lames sales

1. *Lames sales par l'huile à immersion*

Frotter les lames, une à une, avec du papier journal pour enlever le maximum d'huile.

2. *Lames avec lamelles*

Du bout d'une pince, ou d'une aiguille, faire tomber les lamelles dans un bêcher d'eau (voir plus loin, page 32 comment les nettoyer).



3. *Trempage dans une solution détergente forte*

Préparer une bassine contenant:

- de l'eau froide ou tiède
- du détergent (dans les proportions recommandées par le fabricant)

Laisser tremper 24 heures.

Les détergents contenant des enzymes sont excellents pour nettoyer les lames de sang.

Note: S'il s'agit de lames utilisées pour des échantillons d'urines ou de selles, les faire tremper dans une solution de désinfectant.

4. Nettoyage des lames

Préparer dans une autre bassine une solution détergente faible (15 ml de détergent ordinaire pour un litre d'eau).

Sortir les lames une à une du premier bain détergent fort.

Frotter chaque lame avec un tampon de coton trempé dans le premier bain, puis plonger la lame frottée dans le deuxième, l'y laisser tremper 1 à 2 heures.

5. Rincage des lames

Sortir les lames une à une, de préférence à la pince, ou, sinon, en les saisissant par la tranche. Les rincer séparément sous le robinet, puis les immerger dans une bassine d'eau pendant 30 minutes — c'est la meilleure méthode.

Méthode rapide

Vider le bain détergent faible et remplir la bassine d'eau propre. Changer l'eau trois fois de suite en agitant vigoureusement entre chaque changement.

6. Essuyage, séchage et empaquetage

Procéder comme indiqué ci-dessus pour les lames neuves.

C. Lamelles

Après usage, les lamelles peuvent être récupérées, nettoyées et réutilisées. Pour les nettoyer:

1. Les mettre à tremper dans un grand bêcher, dans une solution détergente faible additionnée de désinfectant dans les proportions suivantes:
 - 200 ml d'eau
 - 3 ml de détergent
 - 15 ml d'eau de Javel ou 5 ml de sel d'ammonium quaternaire.Laisser tremper pendant 2 à 3 heures, en remuant doucement de temps à autre.
2. Rincer lentement le bêcher à l'eau du robinet, à quatre reprises, en agitant doucement.
3. Rincer une dernière fois à l'eau déminéralisée.
4. Egoutter les lamelles en les renversant délicatement sur une compresse de gaze.
5. Les sécher si possible au four Pasteur, à 60°C.
6. Les conserver dans une petite boîte de Pétri. Pour les saisir, utiliser si possible une pince à lamelles.

IV. SERINGUES ET AIGUILLES

Dès qu'un prélèvement a été effectué, enlever le piston, et le rincer ainsi que le corps cylindrique. Remplir ce dernier et insérer le piston; appuyer sur le piston pour chasser l'eau dans l'aiguille. Finalement, retirer l'aiguille et rincer l'ajutage.

1. Seringue à piston bloqué

Pour débloquer le piston, on peut avoir recours à plusieurs méthodes:

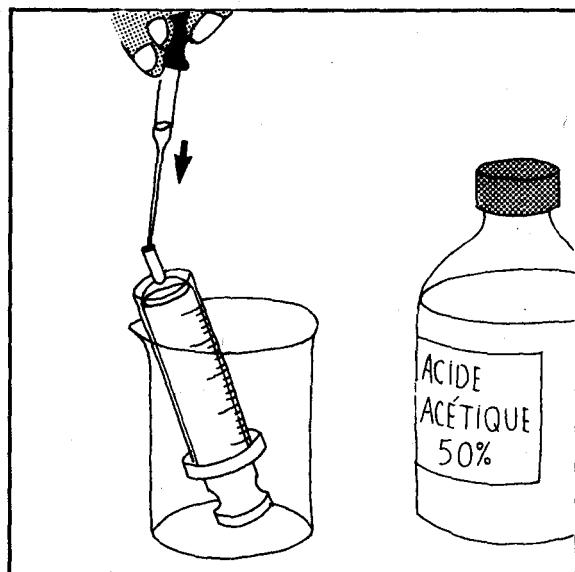
- (a) Faire tremper la seringue pendant 2 heures dans de l'eau chaude (70°C environ).
- (b) Introduire de l'acide acétique dilué à 50%, à l'aide d'une fine pipette Pasteur. Placer la seringue en position verticale, piston en bas. Laisser agir 10 minutes.
- (c) Faire tremper la seringue bloquée pendant plusieurs heures dans un bain d'eau oxygénée à 10 volumes.

2. Rincage et trempage des aiguilles

Aussitôt après usage, rincer l'aiguille quand elle est encore rattachée à la seringue et les faire tremper ensemble.

3. Aiguilles bloquées

Utiliser un fil nylon trempé dans de l'acide acétique à 50%. Sinon, employer un mandrin.



4. Stérilisation

La stérilisation est l'opération qui consiste à débarrasser un objet ou une substance quelconque de toute forme de vie. Le matériel ainsi traité devient exempt de tout germe ou micro-organisme vivant.

Au laboratoire médical, la stérilisation vise essentiellement trois objectifs:

1. Préparer le matériel de prélèvement (aiguilles, seringues, tubes, etc., qui doivent être stériles)
2. Désinfecter le matériel souillé
3. Préparer le matériel nécessaire aux cultures bactériologiques (boîtes de Pétri, pipettes Pasteur, tubes, etc.).

Au laboratoire médical, on stérilise soit par chaleur humide (autoclave, ébullition), soit par chaleur sèche (four Pasteur, flambage).

I. AUTOCLAVE

Principe

De l'eau est chauffée dans un récipient clos. Il se forme de la vapeur d'eau saturée, sous pression, dont la température dépasse 100°C.

Par un chauffage de 20 minutes à 120°C on détruit tous les germes dans cette vapeur d'eau sous pression.

Composition de l'autoclave

1. *Le corps*

Grande marmite cylindrique et profonde à l'intérieur de laquelle sera placé le matériel à stériliser.

2. *Le panier*

Grand panier en métal grillagé qui, placé à l'intérieur du corps, contiendra le matériel à stériliser.

3. *Le support du panier*

Placé dans le fond de l'autoclave pour porter le panier au-dessus de l'eau à chauffer.

4. *Le robinet de vidange*

Fixé à l'extérieur, à la base du corps, pour permettre d'évacuer l'eau en excès.

5. *Le couvercle*

Permet de recouvrir et de fermer l'autoclave; il est doté d'un joint en caoutchouc.

6. *Les vis de serrage du couvercle*

Permettent de serrer le couvercle et, avec le joint de caoutchouc du couvercle, empêchent toute fuite de vapeur.

7. *Le robinet de purge d'air*

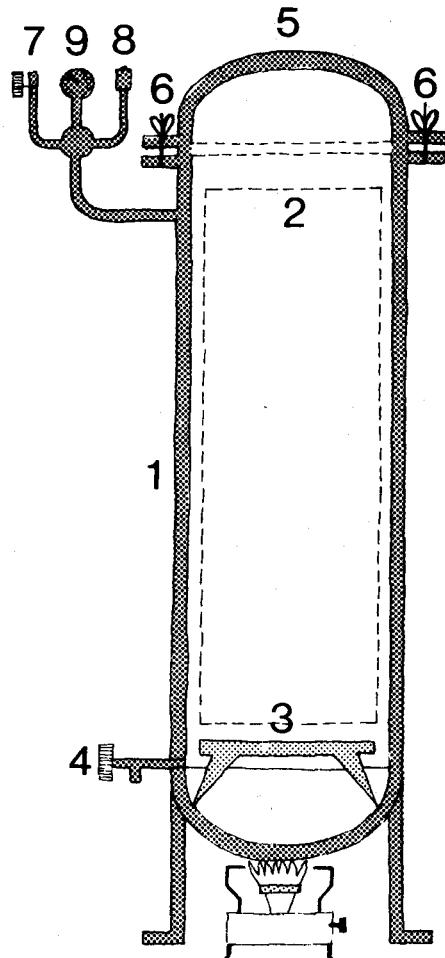
Fixé sur le haut du corps ou le couvercle pour laisser sortir l'air au début du chauffage.

8. *La soupape de sûreté*

Fixée sur le haut du corps ou le couvercle: si la pression augmente exagérément, elle laissera échapper de la vapeur pour éviter l'explosion.

9. *Le cadran du thermo-manomètre*

Fixé sur le haut du corps ou sur le couvercle. C'est un appareil de mesure de la pression et de la température.



Graduations du thermo-manomètre

Tous les thermomètres indiquent la température en degrés Celsius ($^{\circ}\text{C}$); certains (thermo-manomètres) comportent également une deuxième série de chiffres indiquant la pression.

Chauffage de l'autoclave

Il peut être incorporé à l'appareil et être de deux types:

- chauffage électrique ou
- brûleurs à gaz.

Sinon, on place l'autoclave sur un réchaud:

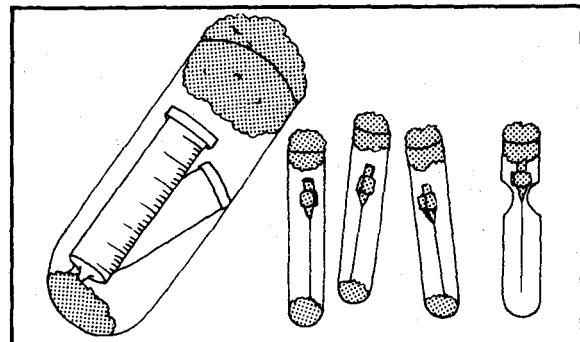
- à gaz butane ou
- à pétrole (Primus).

Comment utiliser l'autoclave

1. Préparation du matériel à stériliser

Seringues

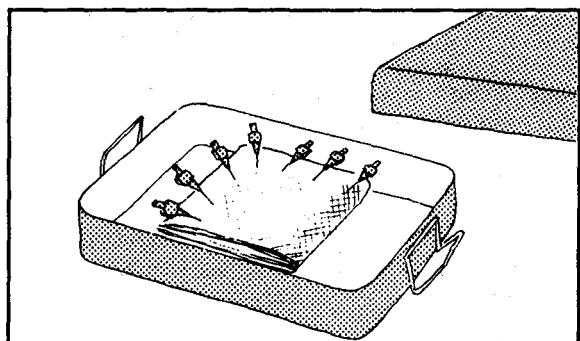
Elles sont placées dans de gros tubes en verre, bouchés au coton cardé (piston et cylindre à part), ou emballées dans une compresse de gaze et rangées dans des boîtes métalliques.



Aiguilles

Les mettre de préférence chacune dans un petit tube en verre, bouché. En protéger la pointe en plaçant au fond du tube un tampon de coton cardé.

Sinon, les disposer à l'intérieur d'une boîte métallique sans couvercle, piquées dans une compresse pliée en deux.

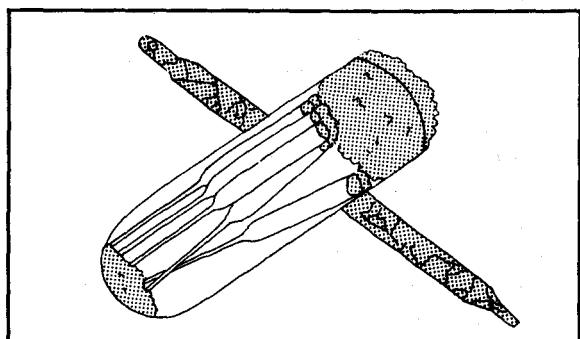


Verrerie

Tubes à prélèvements, boîtes de Pétri, etc. Emballer dans du papier d'emballage brun et ficeler.

Pipettes Pasteur

Les placer dans de gros tubes couchés, ou, à défaut, dans plusieurs couches de papier d'emballage.



2. Stérilisation

- (a) Emplir d'eau le fond de l'autoclave (jusqu'au support du panier).
S'assurer que l'eau ne touche pas le fond du panier. Si nécessaire, éliminer l'excès d'eau en ouvrant le robinet de vidange.
- (b) Placer le panier rempli dans l'autoclave.
(On peut éventuellement ajouter des indicateurs de stérilisation, par exemple des paniers indicateurs qui virent au noir quand la température voulue a été atteinte.)
- (c) Fermer le couvercle en plaçant bien le joint de caoutchouc dans sa rainure. Serrer les vis de blocage du couvercle de manière uniforme, assez fort, mais sans bloquer à fond.
- (d) Ouvrir le robinet de purge d'air.
- (e) Commencer à chauffer l'autoclave.
- (f) Surveiller le robinet de purge d'air jusqu'à ce qu'un jet de vapeur s'en échappe. Attendre 3 à 4 minutes que le jet de vapeur sorte régulièrement et sans à-coup, ce qui signifie que tout l'air contenu dans l'autoclave est sorti.
- (g) Fermer alors le robinet de purge. Serrer à fond les vis de serrage du couvercle et réduire légèrement le chauffage.
- (h) Surveiller le cadran du thermo-manomètre. Lorsque la température désirée est atteinte (par exemple 120°C), il faut la stabiliser. Diminuer un peu la chaleur jusqu'à ce que l'aiguille se maintienne au niveau de température voulu.
- (i) Compter alors le temps nécessaire pour la stérilisation:
 - Pour le matériel de prélèvement (seringues, aiguilles, tubes):
20 minutes à 120°C.
 - Pour le matériel souillé à désinfecter (pots à crachats, tubes de pus):
30 minutes à 120°C.
 - Pour les milieux de culture bactériologique:
suivre les indications du bactériologue ou du chef de laboratoire.

3. Arrêt du chauffage

- (a) Arrêter le chauffage dès que le délai voulu s'est écoulé.
 - (b) Lorsque la température descend au-dessous de 100°C, ouvrir lentement le robinet de purge, ce qui permet à l'air de rentrer dans l'autoclave, pour que la pression soit la même à l'intérieur qu'à l'extérieur.
 - (c) Lorsque le sifflement a cessé, dévisser les vis de serrage du couvercle. Dégager le couvercle. Laisser encore refroidir, puis sortir avec précaution le panier contenant le matériel stérile. Si un peu d'eau s'y est déposé, le laisser sécher si possible à l'incubateur à 37°C.
-

Attention

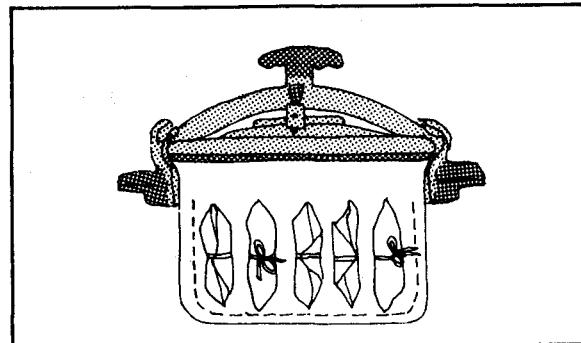
1. Ne jamais toucher au robinet de vidange ou au robinet de purge pendant le chauffage sous pression.
2. Ne jamais toucher à la soupape de sûreté pendant le chauffage sous pression.
3. Ne jamais chauffer trop vite pour augmenter la pression quand le robinet de purge a été fermé.
4. Ne jamais laisser l'autoclave sans surveillance au moment de la montée de la pression.
5. Ne jamais laisser refroidir trop longuement. Si on abandonne l'autoclave pendant plusieurs heures sans ouvrir le robinet de purge, il s'y crée un vide et le matériel stérilisé risque de se briser.

II. UTILISATION D'UNE MARMITE À PRESSION

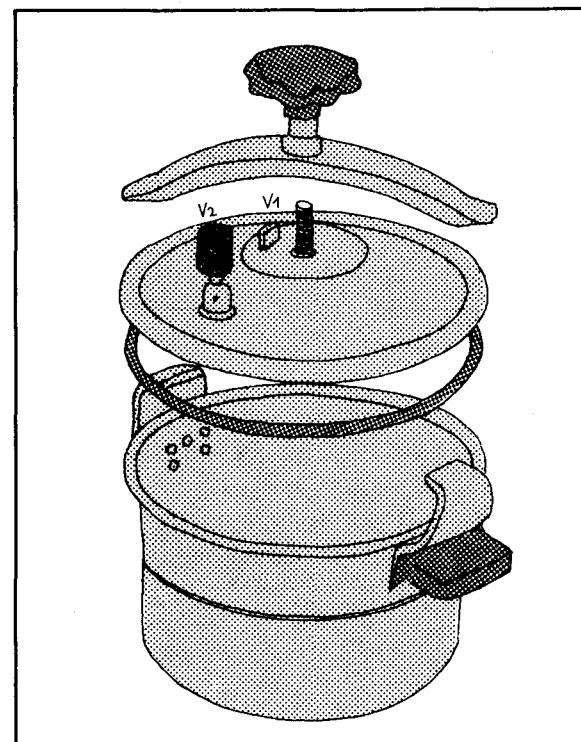
Les marmites à pression (ou autocuiseurs type "Cocotte-minute") sont de grosses casseroles destinées à cuire très rapidement les aliments, à la vapeur sous pression. Dans certains petits laboratoires, on peut les utiliser pour stériliser le matériel de prélèvement.

Modèle à soupape tournante

1. Placer de l'eau dans le fond de la marmite. Déposer le matériel à stériliser dans un panier posé sur un support au-dessus de l'eau. Les articles emballés doivent être placés en position verticale, dans le sens de la hauteur (jamais à plat).



2. Adapter le couvercle. Serrer à fond le bouton de serrage. Placer la soupape tournante (V1) sur son embase, sur le couvercle.
3. Mettre à chauffer sur le réchaud: bientôt la soupape se met à tourner et laisse échapper un jet de vapeur.
4. Attendre que le jet de vapeur sorte sans à-coups. Réduire alors la chaleur pour que la soupape continue à tourner lentement. Laisser chauffer ainsi modérément pendant 20 minutes.
5. Arrêter le chauffage. Laisser refroidir (au besoin sous le robinet d'eau froide). Tirer la soupape tournante pour laisser rentrer l'air. Dégager le couvercle. Sortir le matériel stérile et le laisser sécher.
6. Ne jamais toucher à la soupape de sûreté (V2) qui est fixée au couvercle.



Modèle à soupape fixe

1. La préparation de la marmite et du matériel est identique.
2. Ouvrir la soupape sur le couvercle. Mettre à chauffer.
3. Dès qu'un jet de vapeur régulier s'échappe, fermer la soupape.
4. Attendre le sifflement. Réduire alors la chaleur. Laisser chauffer 20 minutes à feu modéré.
5. Arrêter le chauffage. Laisser refroidir (au besoin sous le robinet d'eau froide).
6. Ouvrir la soupape pour laisser rentrer l'air. Sortir le matériel stérile, etc.
7. Ne jamais toucher à la soupape de sûreté.

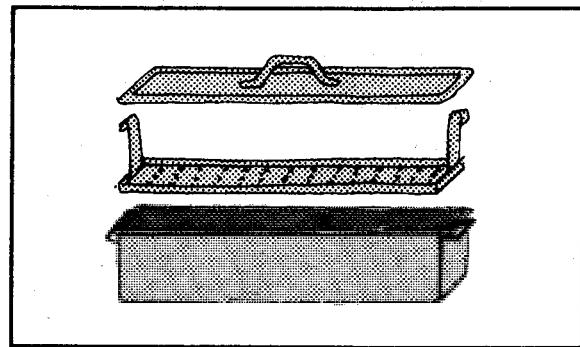
III. STÉRILISATION PAR ÉBULLITION

C'est un procédé de fortune. Utiliser un 'bouilleur', ou, à défaut, une casserole. Remplir d'eau (de préférence déminéralisée). Faire chauffer sur le réchaud.

Le matériel en verre (seringues) est placé dans l'eau froide.

Le matériel métallique (aiguilles, pinces) est placé dans l'eau bouillante.

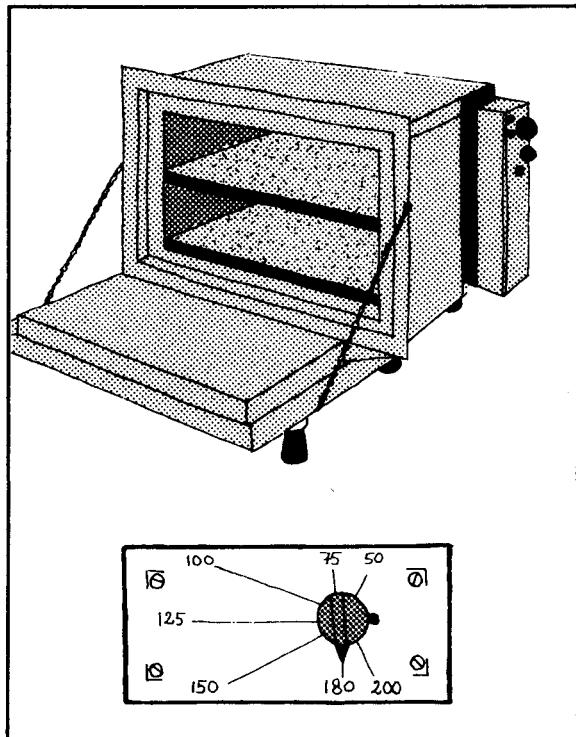
Pour le matériel de prélèvement (seringues, aiguilles), laisser bouillir 20 minutes.



IV. STÉRILISATION AU FOUR PASTEUR

Cette stérilisation par chaleur sèche n'est utilisable que pour le matériel en verre ou en métal (seringues, aiguilles, pipettes, etc.).

1. Préparer le matériel, comme indiqué pour l'autoclave. Ne pas faire de bouchons de coton trop épais pour laisser passer l'air. Soulever les couvercles des boîtes métalliques pour les entrouvrir et les placer face au fond du four.
2. Fixer le thermostat à 175°C et allumer le four. S'il y a un ventilateur, s'assurer qu'il fonctionne.
3. Surveiller le thermomètre; lorsque la température a atteint 175°C, compter 60 minutes de chauffage. S'il s'agit de matériel lourd ou volumineux, ou contenant des poudres, huiles, vaselines, etc., chauffer à 175°C pendant deux heures.
4. Arrêter le chauffage. Attendre que la température redescende à 40°C. Ouvrir la porte du four. Fermer les couvercles des boîtes métalliques. Retirer le matériel stérile. *Les papiers d'emballage doivent avoir viré au brun.* S'ils sont jaune clair, le four n'est pas assez chaud. S'ils sont noircis, le four est trop chaud.

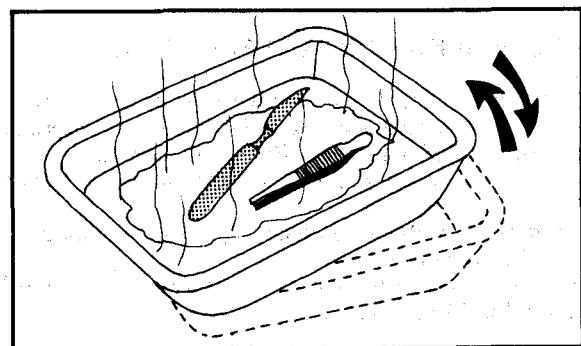


V. STÉRILISATION PAR FLAMBAGE

C'est un procédé qui ne doit être utilisé que pour les articles métalliques tels que pinces ou bistouris, et non pour tout le matériel.

1. Placer les instruments dans un plateau en métal.
2. Verser environ 10 gouttes d'alcool et l'enflammer.
3. Pendant le flambage, incliner le plateau dans un sens, puis dans l'autre.

Les anses de platine, aiguilles pour vaccination ou lancettes utilisées pour prélever des échantillons de sang capillaire doivent être chauffées à la flamme d'un brûleur à gaz ou d'une lampe à alcool, jusqu'à ce qu'elles soient portées au rouge.



5. Destruction des prélèvements et du matériel souillé

Important: Les prélèvements analysés au laboratoire (selles, pus, crachats, urines, etc.) sont souvent infectieux. Il faut les détruire, après examen, pour éliminer tout risque de contagion.

Pour cela, placer les prélèvements:

- dans des boîtes en carton ou des pots en plastique léger qui peuvent être détruits (selles, crachats)
- dans des pots et des flacons en verre qui seront nettoyés et désinfectés pour être réutilisés.

Tous les récipients à jeter ne seront utilisés qu'une seule fois.

BOÎTES À JETER RENFERMANT DES SELLES OU DES CRACHATS

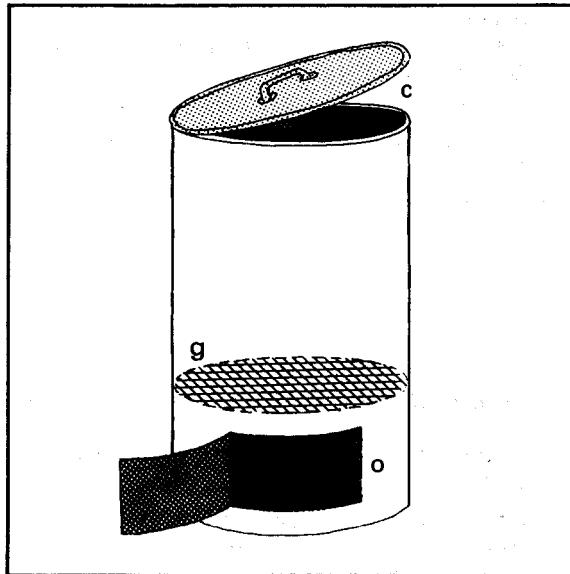
On peut les brûler (incinération) ou les enfouir dans le sol.

L'incinération est la méthode la plus facile et la plus efficace.

A. Incinération

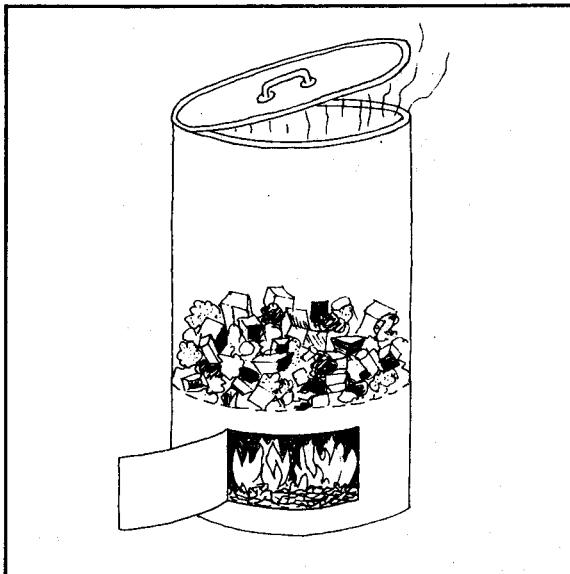
Construction d'un incinérateur

1. Utiliser un vieux fût métallique.
2. Placer au niveau du 1/3 inférieur un grillage solide, bien fixé (g).
3. Découper au-dessous une large ouverture (o).
4. Placer un couvercle mobile sur le haut du fût (c).



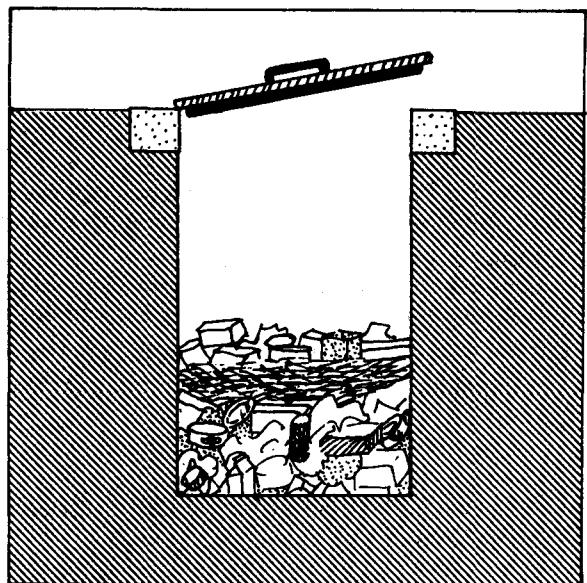
Comment incinérer

1. A la fin de chaque demi-journée de travail, placer toutes les boîtes de selles et de crachats sur la grille.
2. Sauf pendant l'incinération, tenir toujours le fût bien fermé (couvercle du haut et ouverture de la base).
3. Brûler 1 fois par semaine, ou plus souvent, si besoin est. Remplir le fût par le bas avec du papier, du petit bois, des copeaux, etc.
4. Enlever le couvercle. Allumer et entretenir la combustion jusqu'à ce que tout le matériel à éliminer soit complètement réduit en cendres.
5. Les cendres ne sont plus dangereuses et peuvent être jetées à la décharge.



B. ENFOISSEMENT

- (a) Creuser une fosse de 4 à 5 mètres de profondeur et de 1 à 2 mètres de large.
- (b) Prévoir un couvercle hermétique pour fermer la fosse. Il est conseillé de faire renforcer le pourtour du haut de la fosse par une maçonnerie (briques ou pierres).
- (c) Deux fois par jour, jeter au fond de la fosse les boîtes de selles et de crachats ou autre matériel à éliminer. Remettre aussitôt le couvercle.
- (d) Chaque semaine, recouvrir le dépôt d'une couche de feuilles mortes (d'une épaisseur d'environ 10 centimètres).
- (e) Si c'est possible, au lieu de feuilles mortes, déposer, 1 fois par semaine, *une couche de chaux vive*.



STÉRILISATION ET NETTOYAGE DES RÉCIPIENTS RÉUTILISABLES

Cette méthode est plus délicate, aussi, chaque fois que c'est possible, préférer les récipients à détruire après un seul usage.

Les pots et les flacons peuvent contenir:

- des matières très dangereuses (selles, crachats, pus, LCR)
- d'autres prélèvements (sang, urine).

A. Pots de selles

Remplir les pots contenant des selles d'une solution de phénol à 5% ou d'un autre désinfectant analogue. Laisser agir 24 heures. Vider dans les latrines. Si celles-ci sont raccordées à une fosse septique, ne pas ajouter de phénol ou d'autre antiseptique. Nettoyer au détergent, puis à l'eau (comme il est dit à la page 29).

B. Pots à crachats et tubes de pus ou de LCR

Il existe plusieurs procédés:

Autoclave

C'est la meilleure méthode.

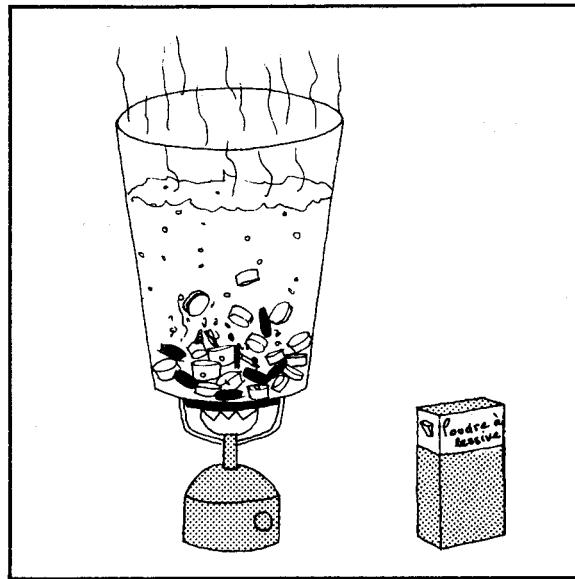
1. Placer les pots tels quels dans l'autoclave et stériliser pendant 30 minutes à 120°C, pour détruire tous les germes.
2. Après refroidissement, les vider dans un évier ou dans les latrines.
3. Nettoyer à l'eau et au détergent.

Ebullition dans un détergent

Utiliser un grand récipient réservé à cet usage.

Faire bouillir les pots à crachats:

- pendant 30 minutes
- dans de l'eau additionnée d'une forte dose de poudre à lessive (ou, mieux, de cristaux de carbonate de soude), à raison de 60 ml par litre d'eau.



Formol (réactif No. 26) ou phénol

Verser dans chaque pot à crachats:

- 10 ml de formol ordinaire pur, ou
- 5 ml de phénol à 5%.

Laisser agir 24 heures.

C. Flacons d'urines

Vider les flacons dans les latrines.

Les remplir:

- d'eau javellisée du commerce à 10%, ou
- d'une solution de phénol à 2%.

Laisser agir 24 heures.

D. Tubes de sang

Tubes de sang frais recueilli le jour même:

- rincer à l'eau froide
- laisser tremper dans de l'eau additionnée de détergent (voir page 29).

Tubes de sang vieux de plusieurs jours conservés à température ambiante si bien que des germes ont pu y proliférer:

- les remplir d'eau javellisée du commerce à 10%
- laisser agir 12 heures, puis rincer et nettoyer.

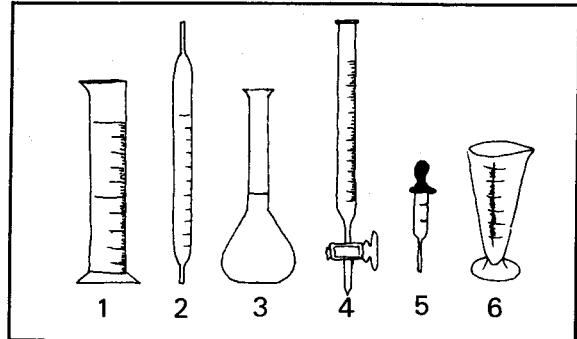
6. Mesures de volume

	microlitre	millilitre ou centimètre cube	litre
Abréviation	μl , mm^3 ("c mm") = 1/1000 ml	ml, cm^3 = 1/1000 litre	1 = 1000 millilitres (ml)

L'unité la plus utilisée au laboratoire est le millilitre (ml).

Pour mesurer les volumes au laboratoire on utilise le matériel suivant:

1. Eprouvettes
2. Pipettes
3. Fioles jaugées
4. Burettes
5. Compte-gouttes calibrés
6. Verres à pied gradués

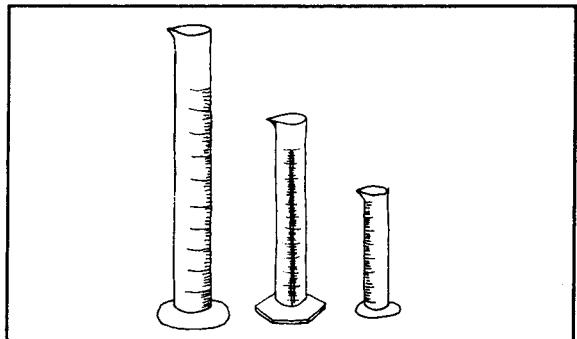


1. ÉPROUVENTES

Elles permettent de mesurer des volumes variables, mais sans grande précision.

Choisir l'éprouvette du volume le plus proche – par exemple:

- mesurer 45 ml avec 1 éprouvette de 50 ml
- mesurer 180 ml avec 1 éprouvette de 200 ml
- mesurer 850 ml avec 1 éprouvette de 1000 ml

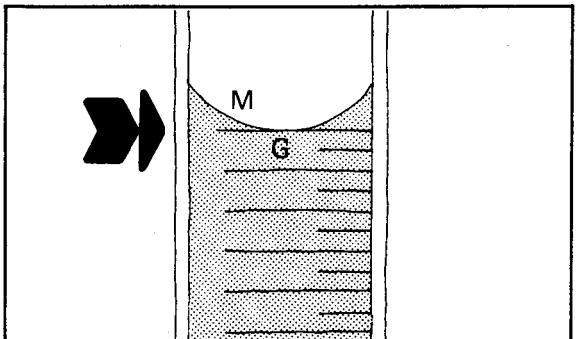


Lecture du niveau

L'eau (et presque tous les liquides) forment dans les conduits de verre un ménisque concave (M).

Le niveau doit être lu au point où le fond du ménisque coïncide avec le trait de graduation (G).

Pour éviter les erreurs de lecture, poser l'éprouvette sur une surface plane et se placer de manière à ce que le niveau des yeux corresponde à la surface du liquide.

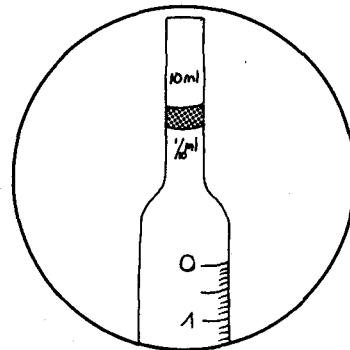


2. PIPETTES

(a) Pipettes graduées

Sur le haut de la pipette figurent des graduations indiquant:

- le volume total mesurable
- le volume entre deux graduations.



Il existe plusieurs types de pipettes:

1. Pipettes graduées terminales (A).

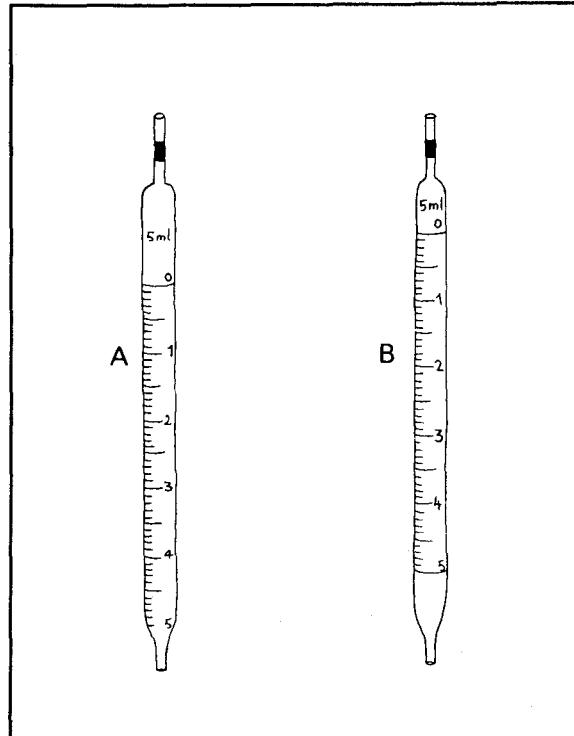
Le volume total mesurable est compris entre la graduation 0 et la pointe.

2. Pipettes graduées non terminales (B).

Le volume total est compris entre la graduation 0 et la dernière graduation au-dessus de la pointe (modèle à préférer pour les épreuves chimiques quantitatives).

Les pipettes graduées permettent de mesurer un volume variable. Utiliser par exemple:

- 1 pipette de 10 ml pour mesurer 8,5 ml
- 1 pipette de 5 ml pour mesurer 3,2 ml
- 1 pipette de 1 ml pour mesurer 0,6 ml

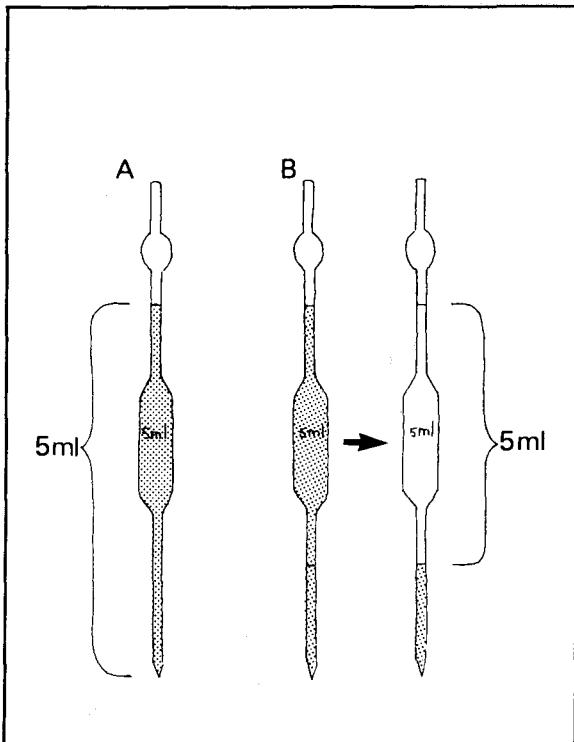


(b) Pipettes jaugées

Elles permettent de mesurer seulement un volume fixe, avec une grande précision (A et B). La pipette de type B est beaucoup moins chère que la pipette de type A, tout en étant suffisamment précise pour les analyses médicales.

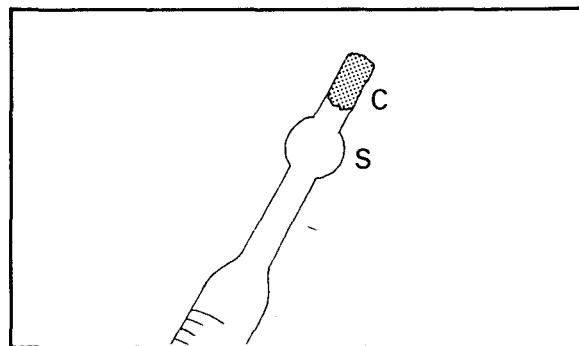
Il en existe deux autres types:

1. Pipettes à un seul trait (A), à remplir jusqu'à la marque. Une fois le contenu vidé, laisser égoutter la pipette pendant 15 à 45 secondes (selon la taille indiquée sur le bulbe) et éliminer la dernière goutte sur le bord du récipient. Ne pas souffler pour l'expulser.
2. Pipettes à 2 traits (B). Confié à des mains expertes, ce modèle est peut-être plus précis, mais quand on la vide on risque facilement de dépasser la marque inférieure.



Pour mesurer des liquides dangereux

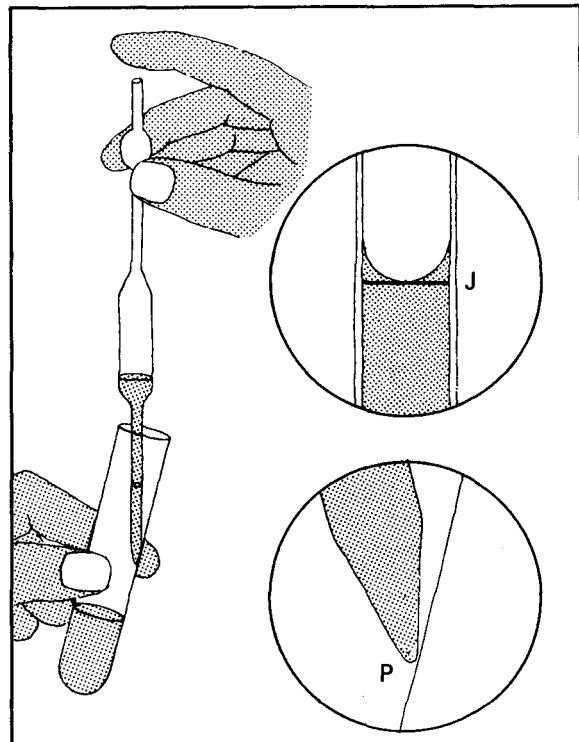
1. Utiliser des pipettes avec boule de sécurité (S) près de l'ouverture
2. Boucher le haut de la pipette avec du coton cardé (C) ou
3. Aspirer la solution à l'aide d'un compte-gouttes spécial (c'est de loin la meilleure méthode).



Comment tenir la pipette

Tenir la pipette bien verticale pour vérifier que le liquide atteint le trait de jauge (J). Le fond du ménisque formé par le liquide doit coïncider avec le trait de jauge.

La pointe (P) de la pipette doit être appliquée contre la paroi du récipient.



3. FIOLES JAUGÉES

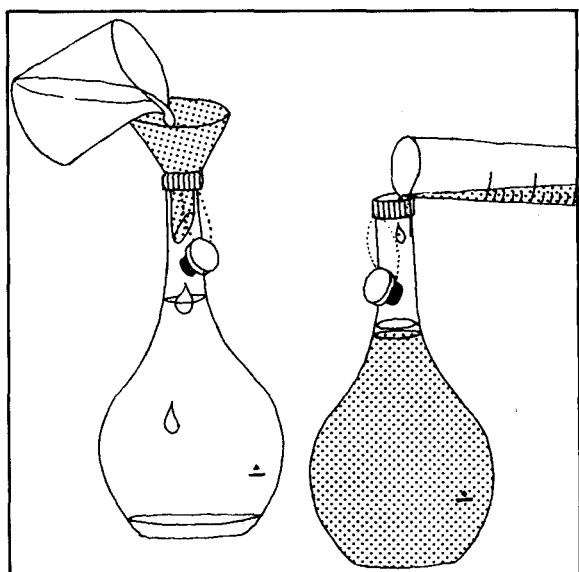
Elles permettent de mesurer des volumes fixes par remplissage de la fiole jusqu'à son trait de jauge.

Il y a des fioles de dimensions variables:

- 2000 et 1000 ml
- 500 ml
- 250 et 200 ml
- 100 ml
- 50 et 25 ml

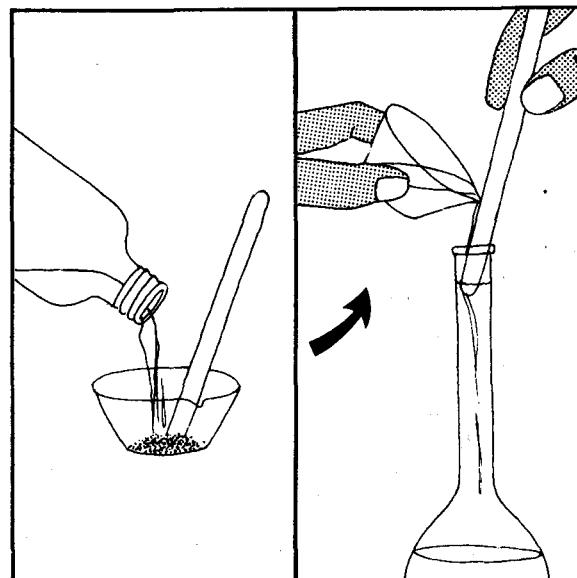
Les fioles jaugées sont plus précises que les éprouvettes. Les utiliser pour la préparation des réactifs.

Par exemple: on préparera 1 litre de soluté physiologique (réactif No. 47) en versant 8,5 grammes de chlorure de sodium dans une fiole de 1000 ml, à l'aide d'un entonnoir, puis en diluant (tout en remuant) dans l'eau jusqu'à atteindre la marque 1000 ml.



On peut aussi dissoudre la ou les substances dans un peu d'eau et verser le tout dans la fiole, le long d'un tube de verre.

Rincer plusieurs fois le récipient employé pour dissoudre le produit, en versant l'eau à chaque fois selon le même procédé. Remplir d'eau jusqu'à la marque. (Cette méthode est recommandée pour la préparation des réactifs chimiques titrés.)



Température du liquide

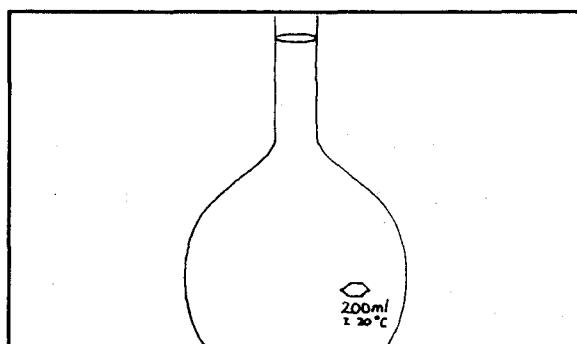
Sur la fiole, est indiquée la température idéale pour la mesure (gravée après le chiffre du volume mesurable).

Par exemple:

- 200 ml: 20°C.

En effet, la chaleur dilate les liquides, le froid les contracte.

Ne jamais faire la mesure de liquides chauds, ou de liquides froids sortant juste du réfrigérateur.



Bouchons

Les bouchons des fioles doivent être en plastique dur (de préférence) ou en verre rodé. Veiller à ne pas les perdre et, pour cela, les attacher au col de la fiole avec une ficelle ou un fil.

Prix des fioles

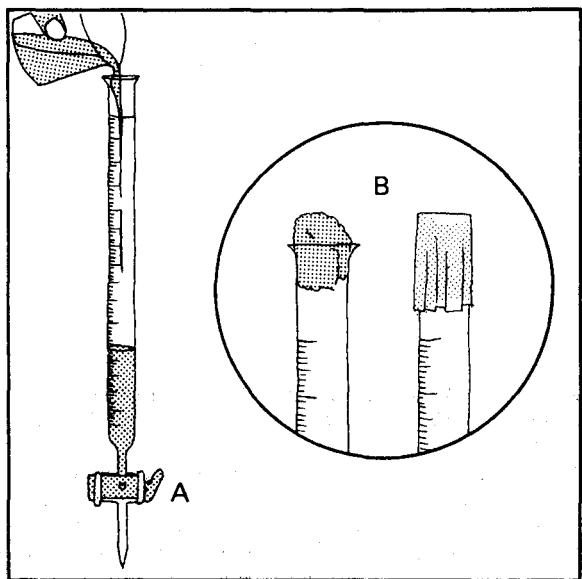
Les fioles jaugées coûtent très cher, aussi doit-on en prendre le plus grand soin.

4. BURETTES

Ce sont des tubes de verre gradués et fermés à la base par un robinet également en verre. Les burettes se remplissent par le haut. Elles ont une contenance de 10, 20, 25 ou 50 ml.

Robinet (A)

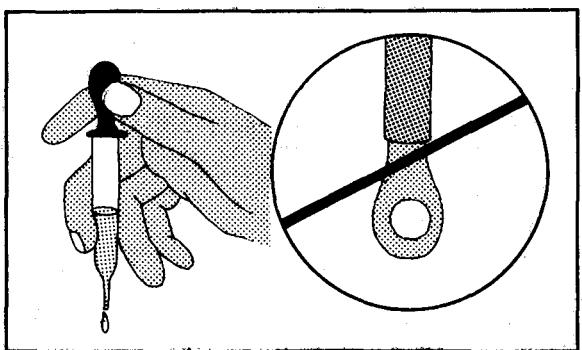
Les robinets doivent être tenus bien graissés; pour cela, appliquer du bout du doigt une dose infime de vaseline des deux côtés du bocal, sans atteindre l'orifice capillaire. Puis, insérer le bocal dans la burette et le faire pivoter sur lui-même jusqu'à ce qu'il soit complètement graissé. Garder les burettes bouchées ou coiffées (B).



5. COMPTE-GOUTTES CALIBRÉS

Les compte-gouttes calibrés ordinaires donnent souvent 20 gouttes pour 1 ml d'eau distillée, soit 1 goutte = 0,05 ml.

Pour compter les gouttes, tenir le compte-gouttes parfaitement vertical. S'assurer que les gouttes ne contiennent pas de bulles d'air.



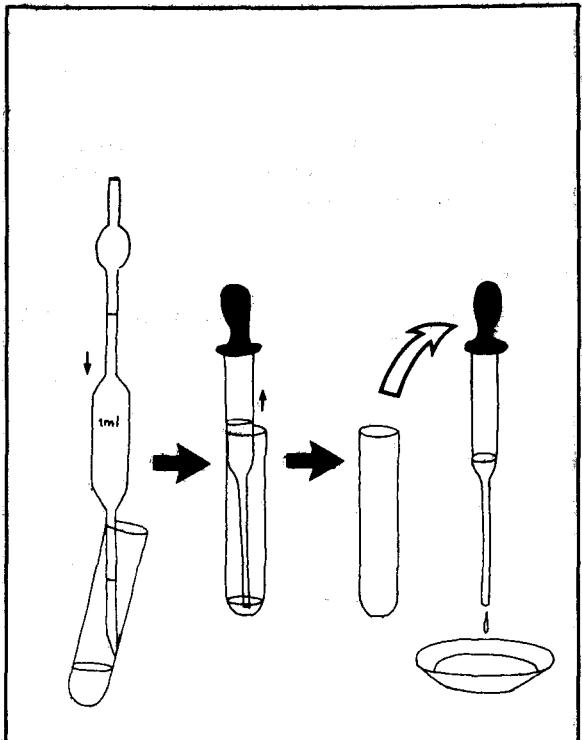
Etalonnage d'un compte-gouttes

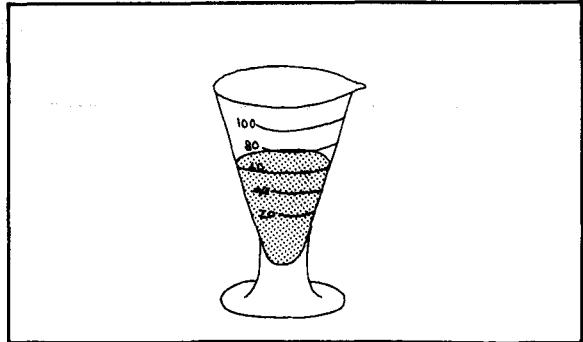
A l'aide d'une pipette jaugée, mesurer 1 ml d'eau dans un petit tube.

Prélever cette eau avec le compte-gouttes à étalonner.

Le vider complètement en comptant les gouttes.

Répéter l'opération 3 fois pour être sûr du résultat.





6. VERRES À PIED GRADUÉS

Ils sont peu précis. Eviter de les utiliser pour les épreuves de laboratoire.

PRÉCIS	PEU PRÉCIS	IMPRÉCIS
Pipettes Fioles jaugées	Eprouvettes Compte-gouttes calibrés	Verres à pied

ATTENTION

1. Ne jamais mesurer le volume de liquides chauds (ils sont dilatés).
2. Ne jamais porter à la flamme de la verrerie graduée.
3. Ne jamais laisser tremper de la verrerie graduée dans une solution alcaline (soude, potasse, ammoniaque).

7. Balances

UNITÉS DE POIDS

	milligramme	centigramme	décigramme	gramme	kilogramme
Abréviation	mg(10^{-3} g)	cg(10^{-2} g)	dg(10^{-1} g)	g	kg(10^3 g)
Valeur correspondante	$\frac{1}{1000}$ g	$\frac{1}{100}$ g	$\frac{1}{10}$ g	$\frac{1}{1000}$ kg	1000 g

Sensibilité d'une balance

C'est la valeur de la plus petite masse qui peut déplacer l'aiguille de la balance d'une division de la graduation. Par exemple: si la balance est sensible à 1 mg, il faut au moins 1 mg pour déplacer l'aiguille.

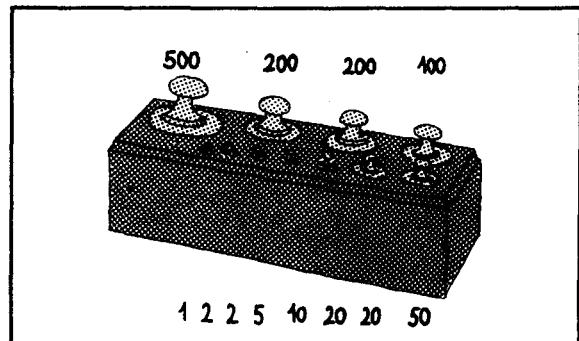
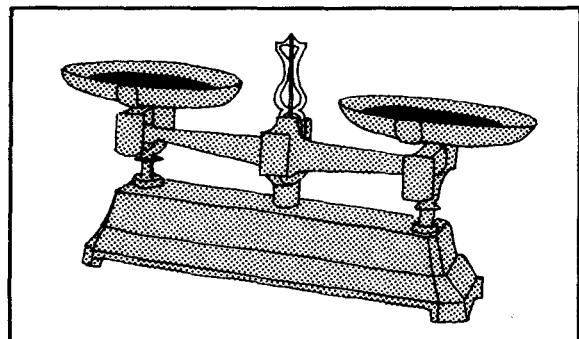
Dans la pratique courante du laboratoire, on peut aussi considérer que la sensibilité d'une balance est la valeur de la plus petite masse qu'elle peut mesurer avec exactitude.

1. BALANCE DE ROBERVAL

Cette balance comporte 2 plateaux supportés par 2 tiges. Elle peut être utilisée avec des poids (voir illustr.) ou comporter un bras gradué doté d'un poids coulissant (balance de Harvard). Elle permet de peser des masses importantes (jusqu'à plusieurs kilogrammes), sans trop grande précision, par exemple: 22,5 g, 38 g, 8,5 g, 380 g.

Sensibilité: 0,5 g (500 mg).

Si les plateaux sont faits d'un matériau qui risque de se rayer ou de se corroder facilement, les protéger à l'aide de rondelles découpées dans du plastique fort ou de vieux clichés radiographiques de même poids.



Boîte de poids pour balance de Roberval.

2. BALANCE DE PRÉCISION

Cette balance se compose de 2 plateaux suspendus à un fléau. Elle est placée dans une cage de verre.

L'utiliser pour peser:

- de petites quantités (jusqu'à 20 ou 200 g, selon les modèles)
- des poids bien précis: par exemple 3,85 g, 0,220 g, 6,740 g.

Sensibilité: 0,5 à 0,1 mg, selon les modèles.

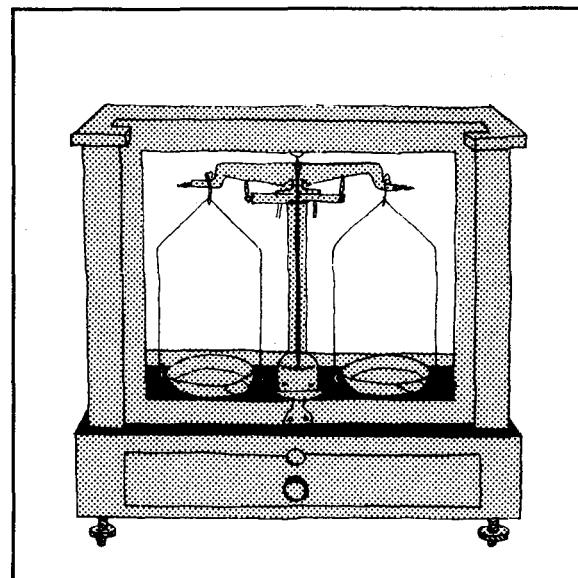
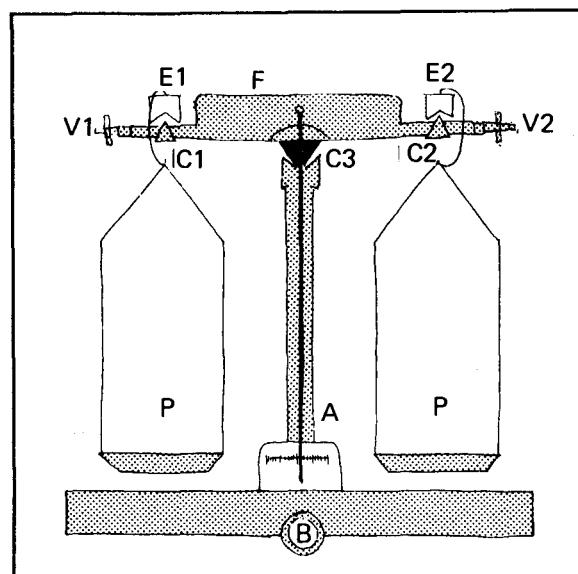
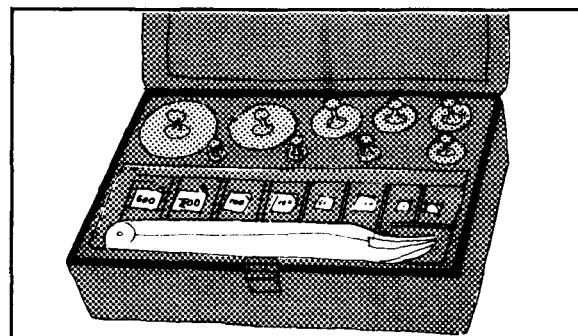


Schéma de la balance

- F = fléau, auquel sont accrochés les plateaux.
 C = couteaux (C₁, C₂, C₃). Le couteau central est le point d'appui du fléau pendant la pesée et assure la précision de la balance. Les couteaux latéraux soutiennent les plateaux suspendus.
 E = étriers (E₁, E₂)
 A = aiguille
 P = plateaux
 B = vis de blocage du fléau. Elle arrête le plateau, afin que la brusque adjonction de poids ou de substances chimiques ne fausse pas les couteaux, qui sont délicats.
 V = vis de réglage de l'équilibre (V₁, V₂), qui ne servent qu'à remettre à zéro la balance vide.



Boîte de poids pour balance de précision.
 Poids de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 et 500 g.
 et de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 et 500 mg.



Précautions à prendre

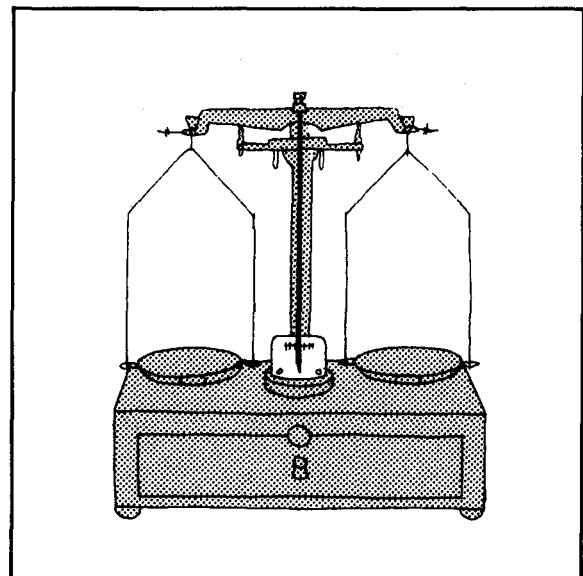
1. Toujours placer le fléau au repos (vis de blocage desserrée), avant de déposer sur les plateaux les poids et les substances à peser.
2. Toujours placer le fléau au repos avant d'enlever des plateaux les poids et les substances pesées.
3. Toujours déposer les substances à peser sur une feuille de papier pliée en 4, un verre de montre, ou une capsule de porcelaine.
4. Toujours saisir les poids avec des pinces.
5. S'assurer que les plateaux sont bien en équilibre en desserrant la vis de blocage, après avoir fermé la cage de verre.
6. Utiliser les vis de réglage de l'équilibre V1 et V2 pour équilibrer parfaitement la tare.
 - En dévissant vers l'extérieur, on augmente la charge.
 - En revisant vers la colonne centrale, on diminue la charge.

3. TRÉBUCHET

Cette balance comporte également 2 plateaux suspendus, mais pas de cage de verre, ni d'amortisseurs.

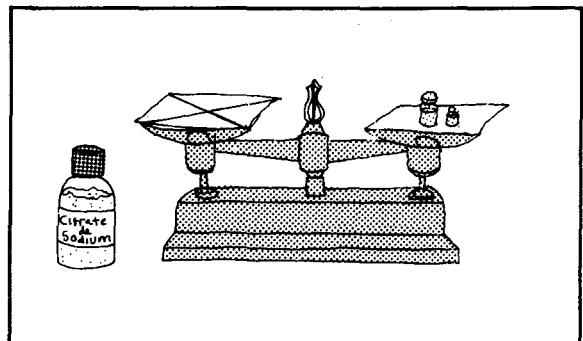
Sensibilité: 5 à 10 mg.

C'est un instrument plus précis que la balance de Roberval mais qui ne peut peser que 50g au maximum. (Après utilisation, ranger le trébuchet dans une armoire fermée).



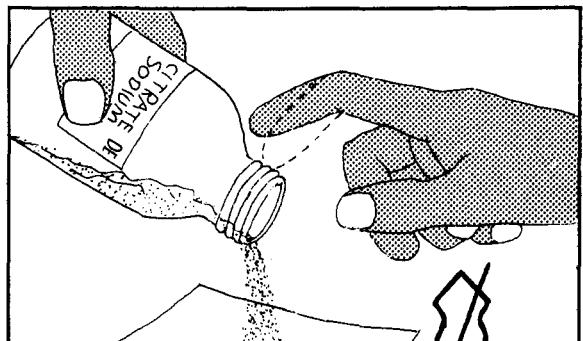
4. MODE OPÉRATOIRE

- (a) Placer le flacon contenant le produit à peser à gauche de la balance.
- (b) Mettre *sur le plateau de gauche* le papier plié ou le récipient qui contiendra le produit à peser.
- (c) Mettre *sur le plateau de droite* la tare du récipient, ainsi que les poids de mesure.



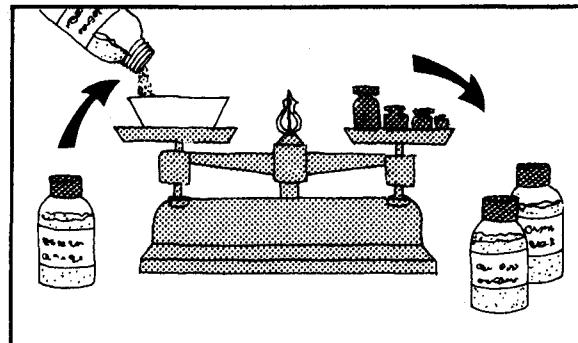
- (d) Pour faire tomber la substance à peser:

- tenir le flacon incliné dans la main gauche (étiquette en haut)
- tapoter légèrement avec la main droite l'encolure du flacon pour faire tomber petit à petit la poudre ou les cristaux à peser
- pour peser de petites quantités, utiliser une spatule propre.



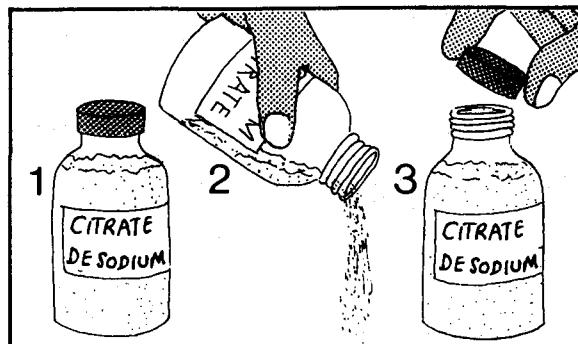
- (e) Dès qu'une substance a été pesée, placer le flacon à droite de la balance. Ainsi:
- produit pesé à droite
 - produit non pesé à gauche.

On évite ainsi tout risque de confusion.



- (f) Lire les étiquettes 3 fois:

- avant de prendre le flacon pour la pesée
- pendant la pesée (étiquette en haut)
- après la pesée, en plaçant le flacon à droite de la balance.



8. Centrifugeurs*

* également appelés 'centrifugeuses'.

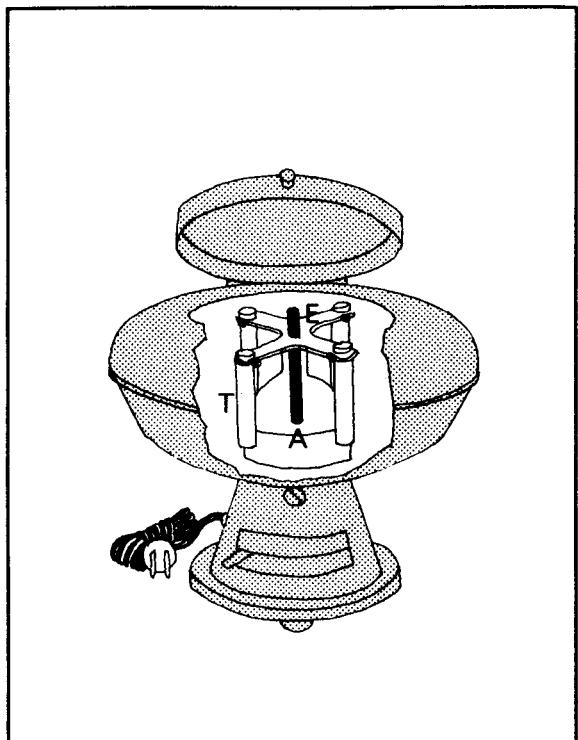
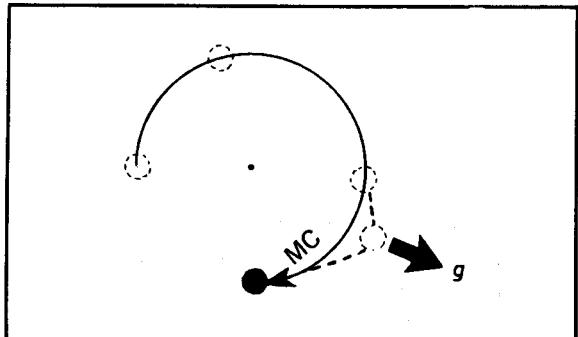
La force centrifuge

Lorsqu'un corps est soumis à un rapide mouvement circulaire (MC), une force tend à le pousser loin du centre de ce mouvement de rotation: c'est la force centrifuge (g).

Il faut *toujours* suivre les instructions du fabricant pour utiliser un centrifugeur, mais il est possible de calculer à partir de g le nombre de tours/minute (t/min) d'un centrifugeur donné. Pour cela, mesurer le rayon (r) du bras rotatif et appliquer la formule:

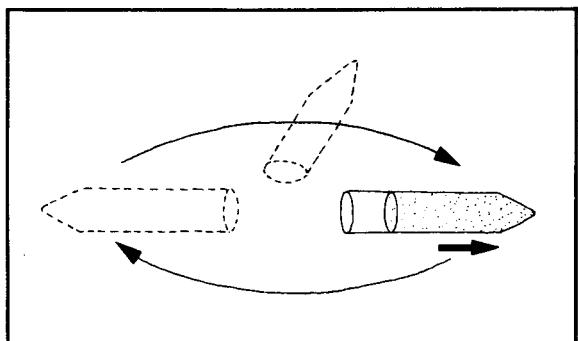
$$g = r \times (r/\text{min})^2 \times 118 \times 10^{-7}$$

Ainsi, pour un rayon de 25 cm, 500 g correspond à 1300 tours/minute environ.



Les centrifugeurs comprennent:

- un axe vertical (A) qui tourne à grande vitesse
- une étoile porte-tubes (E) fixée sur cet axe, et tournant avec lui
- des tubes (T) fixés aux quatre bras de l'étoile et contenant les liquides à centrifuger.

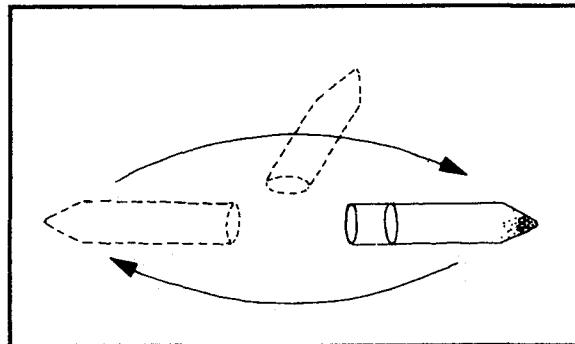


Lorsque l'axe tourne, la force centrifuge s'exerce sur les tubes. Ils se mettent à l'horizontale et les particules en suspension dans les liquides sont repoussées vers le fond des tubes.

Ainsi les particules se rassemblent dans le fond des tubes à centrifuger et y forment le culot de centrifugation.

Ce culot peut ensuite être séparé du surnageant et examiné. Il peut contenir les éléments suivants:

- globules du sang
- œufs de parasites (dans une dilution de selles)
- cellules des voies urinaires (dans l'urine), etc.



DIFFÉRENTS TYPES DE CENTRIFUGEURS

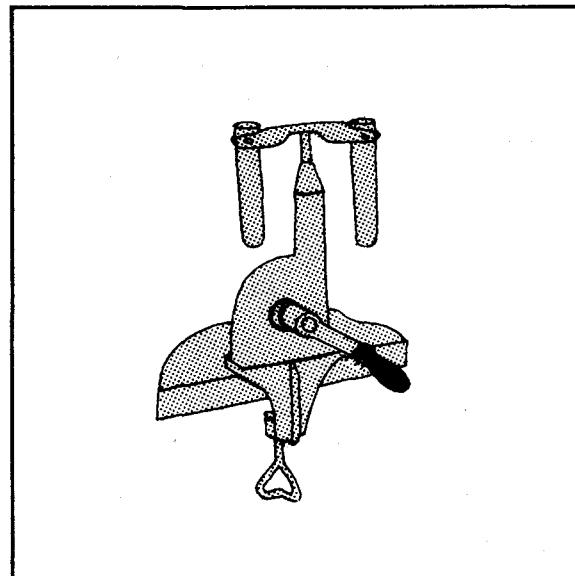
A. Centrifugeur à main

Il est actionné par une manivelle tournée à la main.
Il comporte 2 ou 4 tubes.

Emploi

1. Examen des sédiments urinaires
2. Examen de certaines concentrations parasitaires des selles.

Sa vitesse est insuffisante pour une bonne séparation des hématies du plasma sanguin.



Important:

1. Bien fixer le centrifugeur à main sur un support stable (rebord d'une table).
2. Equilibrer parfaitement les 2 tubes opposés (comme il est dit page 54).
3. Se tenir à distance lorsqu'on centrifuge.
4. Pour arrêter la centrifugation, ne pas freiner le mouvement de la manivelle, mais tirer d'un coup sec la manivelle hors de la machine.
5. Retirer les tubes lentement et avec précaution (pour ne pas remettre le culot en suspension).
6. Graisser périodiquement l'axe du centrifugeur.

Attention: Le centrifugeur à main pouvant provoquer de graves blessures, il importe de respecter scrupuleusement ces instructions.

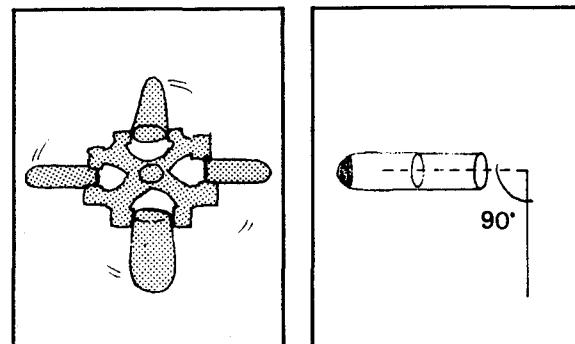
B. Centrifugeurs électriques

Dans certaines régions, on peut utiliser des centrifugeurs à piles.

Il existe deux modèles de centrifugeurs électriques:

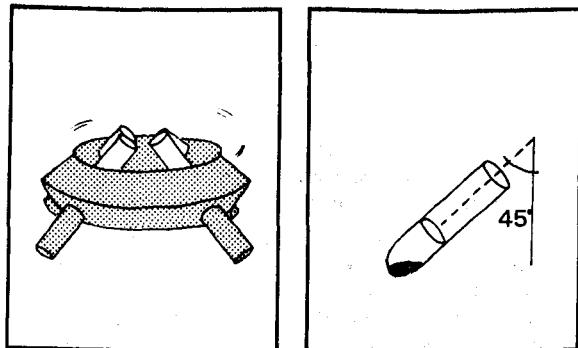
1. Centrifugeurs horizontaux

L'étoile permet aux pots porte-tubes de se mettre en position horizontale lors de la centrifugation.
C'est le modèle le plus utile.



2. Centrifugeurs obliques

Pendant la centrifugation, les tubes restent inclinés à 45° environ. Ce modèle est utile pour certaines techniques: par exemple, les réactions d'agglutination des groupages sanguins en tube. Mais il n'est jamais indispensable pour l'exécution des techniques de ce Manuel.

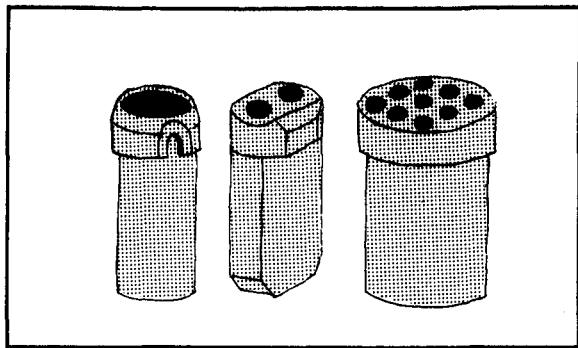


Accessoires des centrifugeurs électriques

Pots porte-tubes

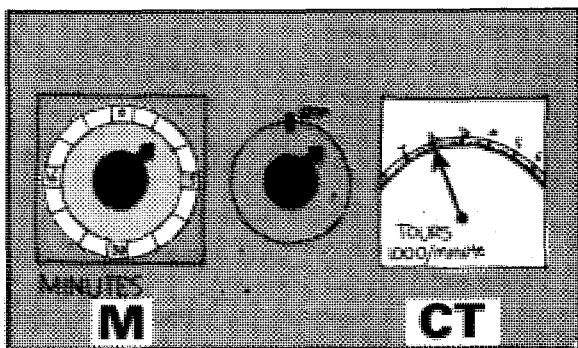
On dispose selon les modèles d'un ou de plusieurs types de pots:

- (a) pots pour un seul tube à fond rond ou conique
- (b) pots pour 2 tubes à fond rond ou conique
- (c) pots pour 9 petits tubes à hémolyse, etc.



Certains modèles possèdent:

- une minuterie (M) qui permet l'arrêt automatique de la centrifugation, après le temps voulu (5 ou 10 minutes par exemple)
- un compte-tours (CT): cadran dont l'aiguille indique la vitesse de rotation pendant la centrifugation (utile pour certaines concentrations parasitaires).

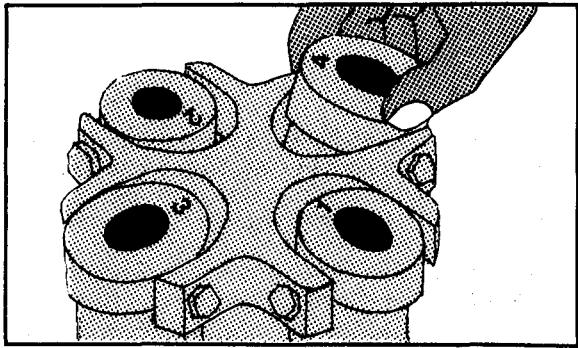


MODE D'EMPLOI

1. Equilibrage

Si les tubes sont numérotés, les placer de la manière suivante:

- tube No. 1 face au tube No. 2
- tube No. 3 face au tube No. 4.

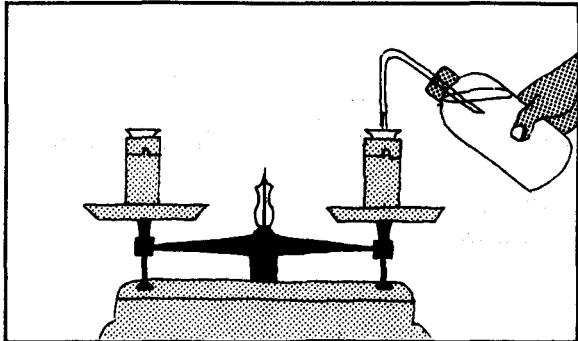


Equilibrer les tubes qui sont opposés l'un à l'autre en les pesant dans leur pot sur une balance Roberval.

Pour obtenir l'équilibre:

- soit rajouter du liquide à centrifuger dans le tube le plus léger
- soit verser de l'eau avec une pissette dans le pot le plus léger.

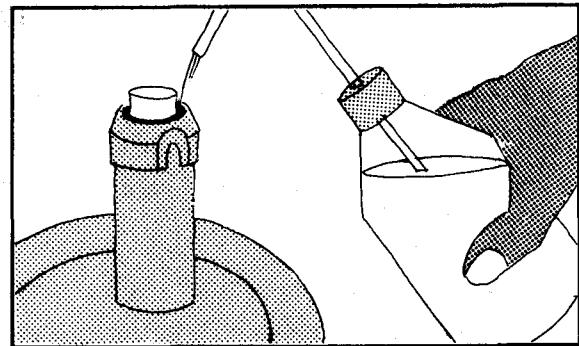
Si on ne doit centrifuger qu'un seul tube, l'équilibrer avec un tube de modèle identique rempli d'eau.



2. Protection des tubes contre la casse

Placer toujours dans le fond des pots les rondelles de caoutchouc fournies avec le centrifugeur pour protéger le fond des tubes à centrifuger.

A l'aide d'une pissette, introduire un peu d'eau entre la paroi du tube de verre et le pot.



3. Mise en marche et arrêt

- (a) Mettre en marche le moteur et augmenter la vitesse d'une manière progressive, en tournant lentement la commande jusqu'à la graduation de vitesse voulue.
- (b) Arrêter également d'une manière progressive (certains modèles comportent une commande "frein" sur laquelle on peut appuyer pour arrêter).
- (c) Retirer les tubes lentement, avec précaution.
- (d) Ne jamais ouvrir le centrifugeur avant l'arrêt complet.
- (e) Ne jamais essayer de le freiner à la main.

4. Nettoyage et graissage

Tenir la cuvette du centrifugeur très propre. Rincer les pots porte-tubes après usage. Eliminer les éventuelles taches de sang, etc.

Pour le graissage, faire appel à un spécialiste qui se conformera aux instructions du fabricant.

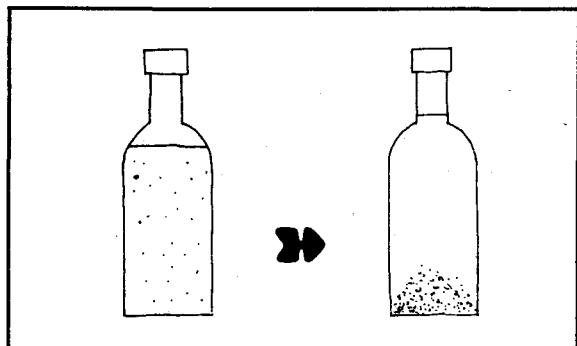
Attention: Si l'on prend l'habitude de centrifuger des tubes sans les avoir équilibrés, on détériorera très rapidement le centrifugeur.

9. L'eau du laboratoire

Pour fonctionner, le laboratoire médical a besoin d'eau en quantité suffisante. Il lui faut:

1. de l'eau propre
2. de l'eau distillée
3. de l'eau déminéralisée (si possible)
4. de l'eau tamponnée (si possible).

Dans certaines régions, l'eau est rare et très souillée. Que faire?



EAU PROPRE

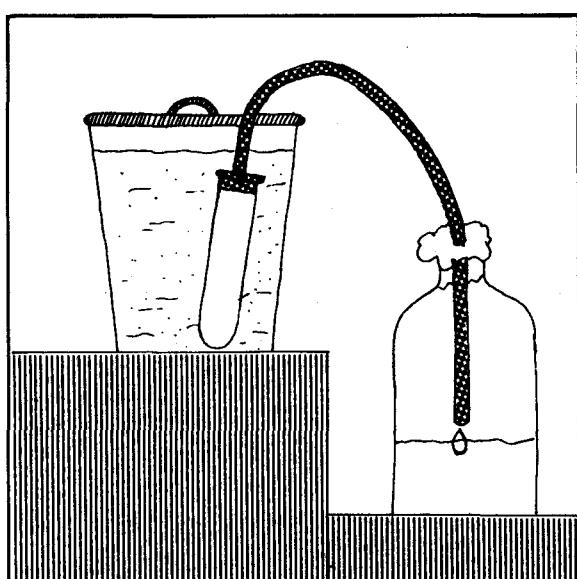
A. Contrôle de la qualité

1. Remplir une bouteille d'eau.
2. Laisser reposer 3 heures.
3. Examiner le fond de la bouteille. S'il y a un dépôt, il faut filtrer l'eau.

B. Filtrage

1. Avec un filtre à paroi céramique poreuse ou une bougie filtrante en verre (type Chamberland ou autre)
 - (a) Brancher le filtre au robinet.
 - (b) Ou l'immerger dans le récipient d'eau à filtrer.

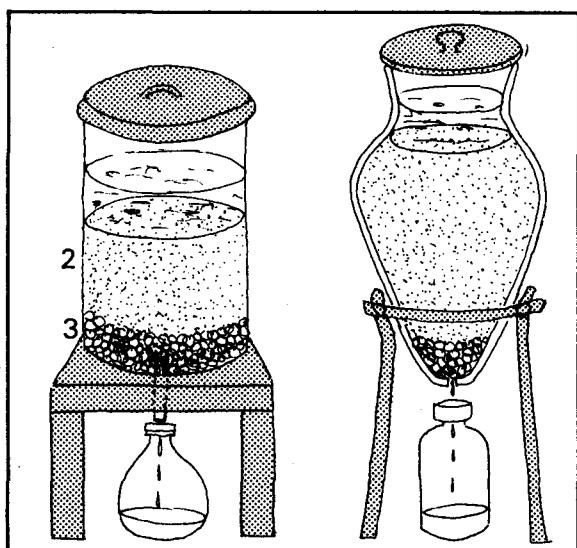
Attention: tous les mois, ce type de filtre doit être démonté et lavé à l'eau bouillante filtrée.



2. Avec un filtre à sable

On peut le préparer au laboratoire. Pour cela, il faut:

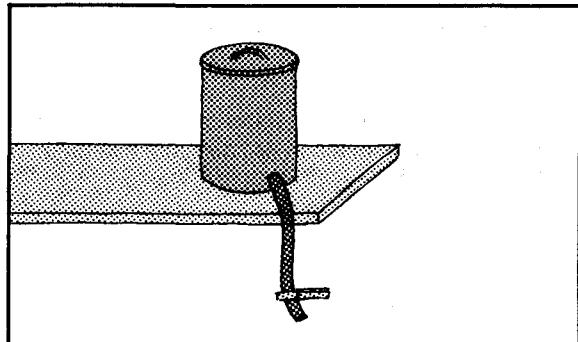
- (a) Un réservoir (grand récipient tel que fût métallique, grande jarre de terre ou seau percé)
- (b) Du sable
- (c) Du gravier.



C. Stockage de l'eau

Si l'eau est rare ou provient d'un réservoir ou d'un puits, en stocker toujours une bonne provision à l'avance, *de préférence dans des récipients en verre ou en plastique.*

Décanter l'eau stockée avant de la filtrer.



D. Distribution d'eau

Si le laboratoire n'a pas d'eau courante, aménager la distribution d'eau de la façon suivante:

1. Mettre le récipient contenant l'eau à utiliser sur une étagère haut placée.
2. Y fixer un tuyau en caoutchouc pour en faire couler l'eau.
3. Adapter au tuyau une pince de Mohr ou une pince à linge.

EAU DISTILLÉE

A. Préparation

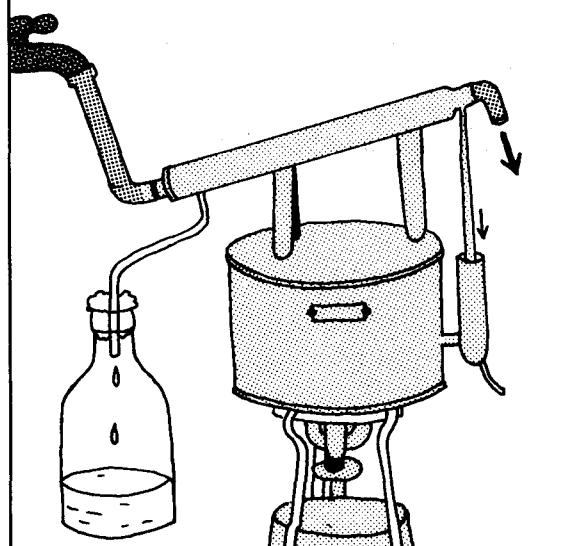
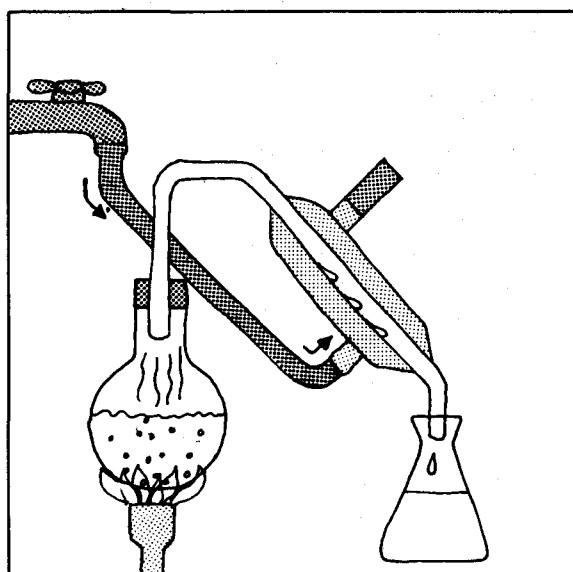
Elle se fait dans un appareil à eau distillée dans lequel:

- de l'eau ordinaire est chauffée jusqu'à ébullition
- la vapeur ainsi obtenue est refroidie, en passant dans un tube réfrigérant, et condensée sous forme d'eau distillée.

Il existe différents types d'appareils:

1. Appareils en cuivre (alambics)
2. Appareils en verre.

Selon le modèle, ils sont chauffés au gaz, au pétrole ou à l'électricité.



1. Alambic en cuivre ou en acier inoxydable

Un des modèles les plus simples est celui de l'UNICEF (ref. 01-680-02).

- (a) Remplir le récipient d'eau à distiller.
- (b) Relier le tube réfrigérant à un robinet d'eau froide.
- (c) Chauffer le récipient:
 - au bec Bunsen, ou
 - sur un réchaud à pétrole (type Primus).

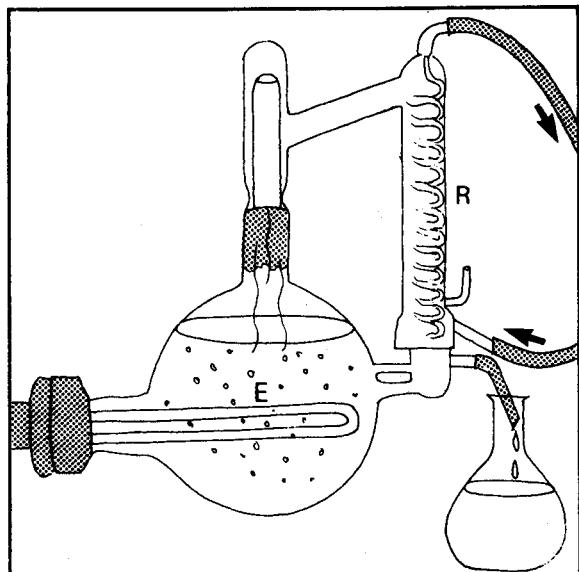
Selon l'efficacité du système de chauffage, l'appareil peut produire 1 à 2 litres d'eau distillée à l'heure.

2. Appareils en verre

Ils sont plus fragiles, mais produisent presque toujours une eau plus pure. Le mode d'utilisation est le même. S'assurer que l'eau circule bien dans le réfrigérant (R). L'eau peut être chauffée dans le ballon par une résistance électrique (E).

Attention:

- Recueillir l'eau distillée dans un récipient en verre ou en plastique protégé de l'air extérieur.
- Ne pas distiller le dernier quart de l'eau chauffée.



B. Contrôle de la qualité de l'eau distillée

Utiliser une solution aqueuse de nitrate d'argent (AgNO_3) à 1,7% (réactif No. 42).

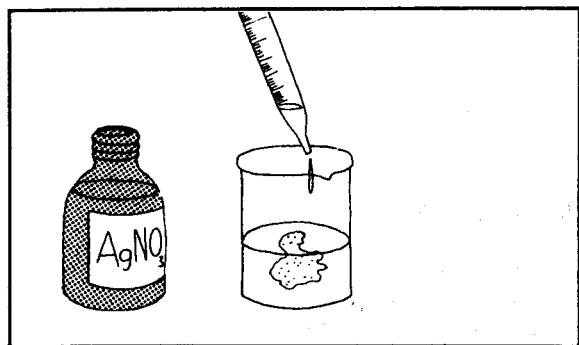
Mettre dans un bêcher:

- 10 ml d'eau distillée
- 2 gouttes d'acide nitrique
- 1 ml de solution de nitrate d'argent.

L'eau doit rester parfaitement claire.

Si elle montre une légère turbidité blanchâtre, elle n'est pas de bonne qualité.

Le pH de l'eau distillée est généralement de 5,0 à 5,5 (elle est donc acide).



C. Utilisation de l'eau distillée

1. Préparation des réactifs
2. Dernier rinçage de certaines pièces de verrerie, avant séchage.

Attention:

1. Ne pas utiliser pour la préparation des réactifs de l'eau distillée du commerce (destinée aux batteries automobiles).
2. Il est toujours préférable d'employer de l'eau fraîchement distillée; si ce n'est pas possible, la stocker dans des récipients en verre ou en plastique, qui seront lavés régulièrement.
3. Toujours utiliser l'eau distillée dans la semaine même.

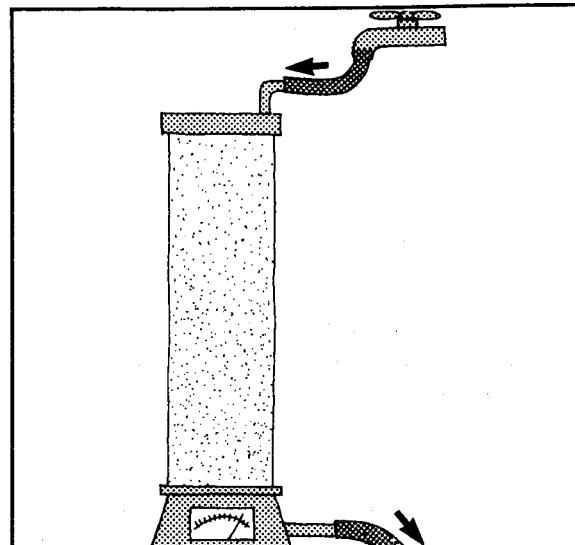
EAU DÉMINÉRALISÉE

Principe

On la prépare en faisant passer de l'eau ordinaire dans une colonne de résine échangeuse d'ions.

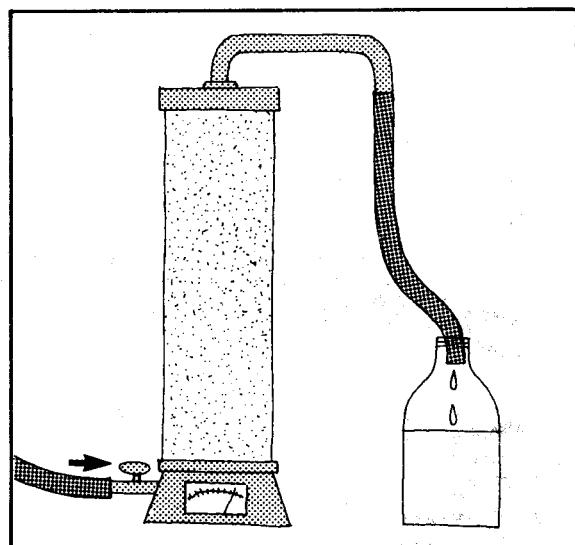
Cet appareil se présente comme une longue cartouche remplie d'une poudre granuleuse, la résine échangeuse d'ions.

L'eau est filtrée à travers cette poudre qui en retient tous les ions minéraux (c'est-à-dire tous les sels minéraux dissous). On obtient ainsi une eau exempte d'ions, appelée aussi *eau déminéralisée*.



A. Préparation

1. Vérifier que la cartouche est complètement remplie de poudre de résine échangeuse d'ions. Certains appareils comportent 2 cartouches à travers lesquelles l'eau passe successivement.
2. Relier le tube d'arrivée de l'appareil à une source d'eau (robinet ou petit tonneau placé plus haut). Sur certains modèles l'arrivée d'eau se fait par le haut de la cartouche, sur d'autres, elle se fait par le bas.
3. Régler le débit pour que l'eau pénètre lentement.
4. Recueillir l'eau déminéralisée dans un récipient fermé.



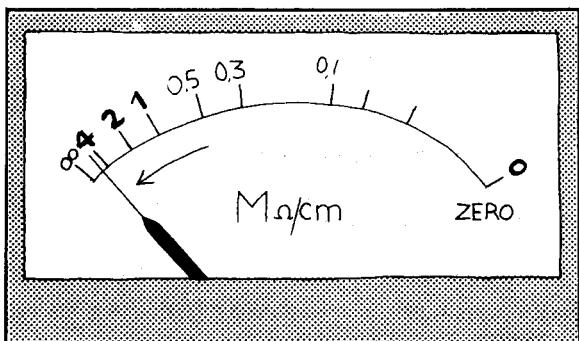
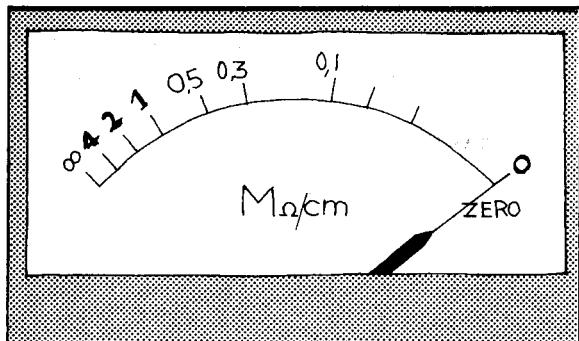
B. Contrôle de la qualité de l'eau déminéralisée

1. Appareil muni d'un cadran de contrôle

Ce système mesure la résistivité de l'eau. Plus l'eau est déminéralisée, moins sa conductivité électrique est grande.

- (a) Vérifier que le système de contrôle contient une pile électrique en bon état.
- (b) Pour vérifier que la pile fonctionne, appuyer sur le bouton de contrôle de la pile marqué "zéro test". L'aiguille doit se placer sur zéro.
- (c) Faire couler l'eau dans la cartouche.
- (d) Quand l'eau déminéralisée commence à sortir de la cartouche, appuyer sur le bouton de contrôle marqué "water test". L'aiguille doit se déplacer et indiquer une résistivité supérieure à 2 még-ohms/cm (2 MΩ/cm).
- (e) Si l'aiguille s'arrête au-dessous de 2 ou reste à zéro, la poudre échangeuse d'ions de la cartouche a trop servi et doit être remplacée ou régénérée.

L'appareil peut être gradué en MΩ/cm pour mesurer la résistivité ou en siemens (S) pour mesurer la conductivité. La plupart des appareils modernes fabriqués en Europe utilisent les siemens.

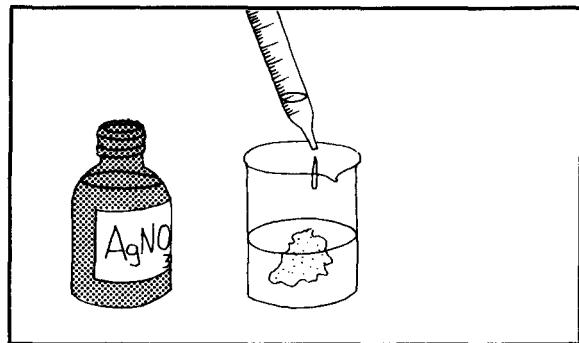


2. Appareil sans cadran de contrôle

- Au moyen d'un papier indicateur, déterminer:
- le pH de l'eau ordinaire alimentant l'appareil
 - le pH de l'eau déminéralisée produite par l'appareil.

Si le pH reste le même (généralement en dessous de 6,5), la résine est hors d'usage. Une bonne eau déminéralisée doit avoir un pH de 6,6 à 7,0.

Pour un contrôle supplémentaire, on peut utiliser une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) à 1,7% (Réactif No. 42). Faire passer dans la résine un peu d'eau légèrement salée (sel de cuisine). Procéder comme indiqué ci-dessus pour le contrôle de l'eau distillée. Si l'eau est légèrement trouble, la résine doit être changée.



3. Changement de coloration de la résine

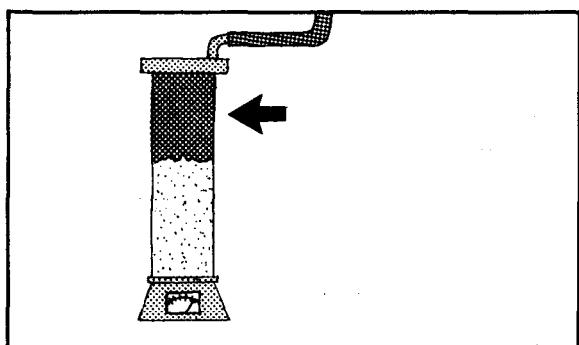
Certaines résines changent de couleur (par exemple, elles noircissent) lorsqu'elles deviennent inefficaces et doivent être remplacées. Consulter, à ce propos, la notice du fournisseur.

4. Remplacement ou régénération de la résine échangeuse d'ions

Selon les modèles d'appareil:

- (a) soit on remplace la cartouche par une autre cartouche remplie de résine prête à l'emploi;
- (b) soit on remplit la colonne avec une résine ou un mélange de deux résines;
- (c) soit on réutilise la résine après l'avoir *régénérée* en y faisant passer une solution d'ammoniaque.

Suivre à cet égard les instructions du fournisseur.



C. Utilisations de l'eau déminéralisée

L'eau déminéralisée est un peu moins pure que l'eau distillée, car elle peut encore contenir des traces organiques. Mais elle est suffisamment pure pour:

- le dernier rinçage de la verrerie avant séchage
- la préparation de presque tous les réactifs utilisés au laboratoire médical, y compris les colorants.

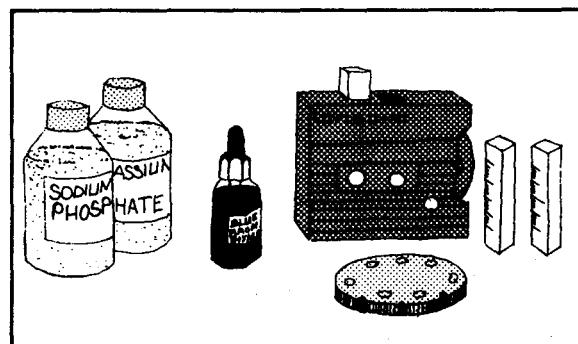
En préparant aussi de l'eau déminéralisée au laboratoire, on peut économiser une partie de l'eau distillée (notamment pour les rinçages).

EAU TAMPONNÉE

L'eau distillée est généralement acide et l'eau déminéralisée le devient au contact de l'air. Pour de nombreux usages au laboratoire (colorations, etc.) il est nécessaire de lui donner un pH neutre, aux environs de 7,0 (eau neutralisée) et de l'y maintenir, si possible en y dissolvant des substances tampons (eau tamponnée).

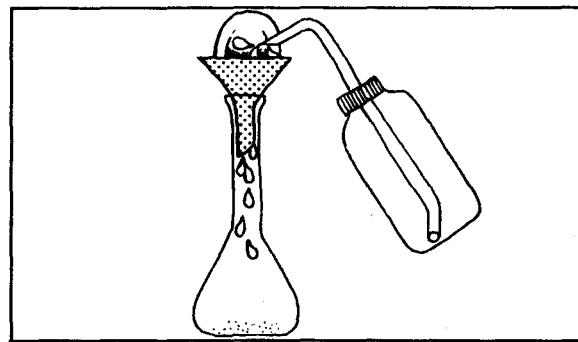
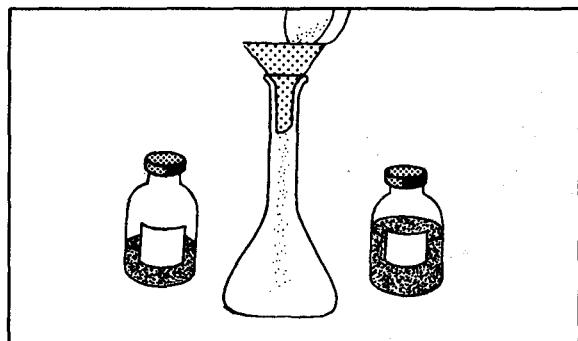
A. Matériel

- (a) Eprouvettes de 10 et de 1000 ml
- (b) Fiole jaugée de 1000 ml
- (c) Comparateur de type "Lovibond" No. réf. UNICEF 931 200 si disponible. A défaut, papiers indicateurs de pH, gamme étroite
- (d) Eau distillée (ou déminéralisée)
- (e) Bleu de bromo-thymol
- (f) Phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- (g) Phosphate monopotassique anhydre (KH_2PO_4).



B. Méthode

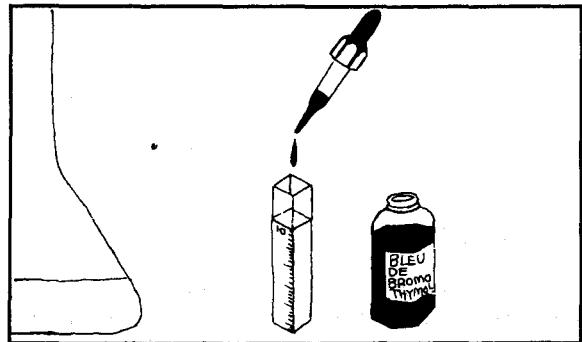
1. Peser très exactement 3,76 g de phosphate disodique hydraté.
2. Verser à travers un entonnoir dans une fiole jaugée de 1000 ml.
3. Rincer plusieurs fois le récipient dans lequel on a pesé le produit et mettre cette eau dans la fiole. Rincer l'entonnoir au-dessus de la fiole.
4. Peser exactement 2,1 g de phosphate monopotassique et procéder comme sous 2 et 3 ci-dessus.
5. Ajouter un peu d'eau et mélanger jusqu'à dissolution des produits.
6. Ajouter de l'eau jusqu'à la marque 1 litre.
7. Reboucher et bien mélanger.
8. Conserver la solution dans un flacon à réactif en verre blanc et au réfrigérateur (réactif No. 20).



9. A l'aide d'une pipette verser dans un tube du comparateur:

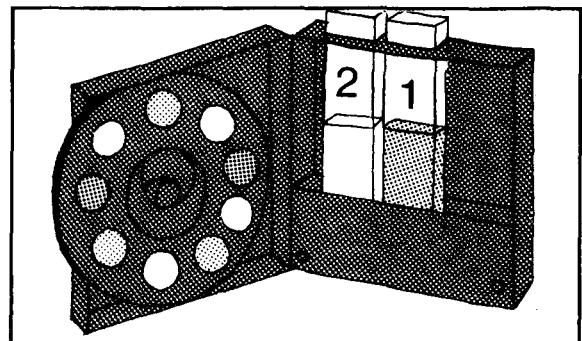
- 10 ml d'eau tamponnée
- 6 gouttes de bleu de bromo-thymol.

Mélanger.



10. Placer ce tube (contenant l'eau tamponnée et l'indicateur) dans le comparateur (tube No. 1).

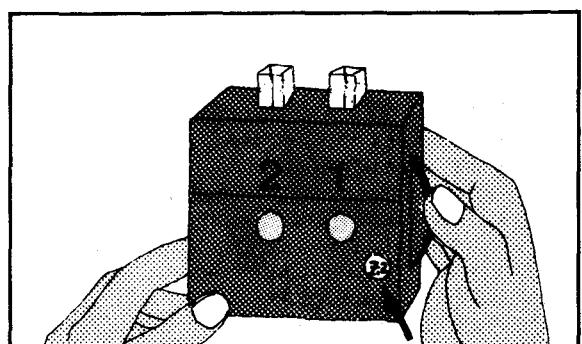
Placer à côté un autre tube uniquement rempli d'eau (tube No. 2).



11. Comparer la couleur du tube (fenêtre 1) à la couleur indiquée du disque coloré (fenêtre 2).

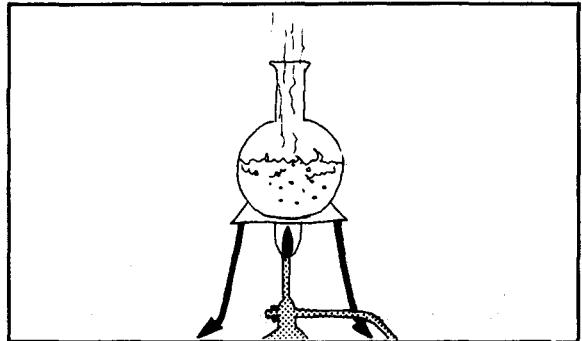
Tourner le disque jusqu'à ce que les 2 fenêtres montrent la même couleur.

Lire alors la valeur du pH en bas et à droite.



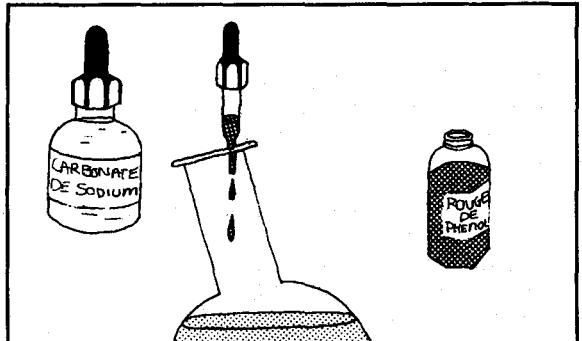
12. pH de 7,0 à 7,2: l'eau tamponnée est bonne.
pH inférieur à 7,0: l'eau est acide.

Dans ce dernier cas recommencer une nouvelle préparation avec de l'eau distillée bouillie pendant 10 minutes dans un ballon ouvert (pour chasser le gaz carbonique).



13. Si l'eau reste acide après l'ébullition:

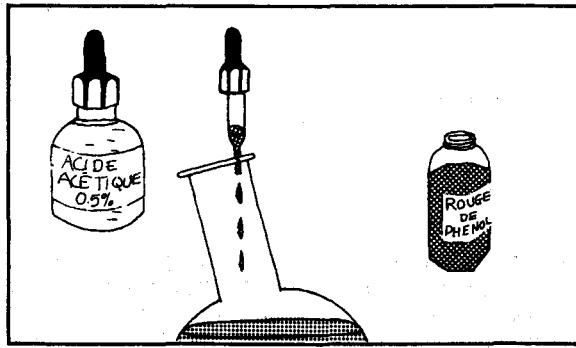
- ajouter 5 gouttes de rouge de phénol par litre d'eau
- neutraliser en ajoutant goutte à goutte de la solution de carbonate de sodium à 0,2% (2 g/l), jusqu'au virage de la coloration au rose.



14. pH supérieur à 7,2 : l'eau est alcaline.

Ajouter 5 gouttes de rouge de phénol par litre d'eau.

Neutraliser en ajoutant goutte à goutte de la solution d'acide acétique à 0,5% (5 g/l), jusqu'au virage de la coloration à l'orange.



Si l'on ne dispose pas de composés phosphatés:

- neutraliser directement l'eau distillée ou déminéralisée comme indiqué ci-dessus de 12 à 14.

Si l'on ne dispose pas de comparateur Lovibond:

- utiliser les papiers indicateurs de pH (voir instructions d'emploi page 309).

Note: Le pH peut aussi être corrigé à l'aide de petites quantités de substances tampons:

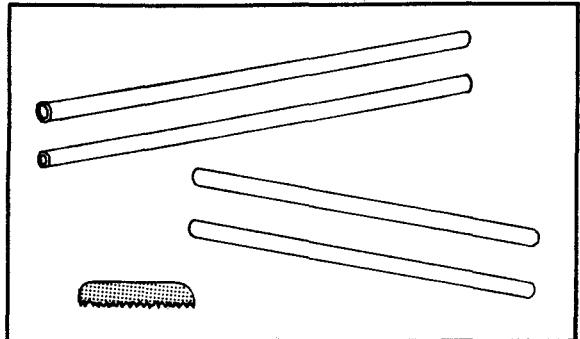
- du phosphate disodique pour accroître le pH, si l'eau est acide (pH inférieur à 7,0)
- du phosphate monopotassique pour réduire le pH, si l'eau est trop alcaline (pH supérieur à 7,2).

10. Travail du verre

Le verre est préparé par fusion à température très élevée d'un mélange de sable et de potasse (ou de soude). Il se forme ainsi du silicate (*verre ordinaire*). On ajoute parfois de l'acide borique au mélange pour former du verre boro-silicaté (Pyrex, etc.), plus résistant aux chocs et à la chaleur. Au laboratoire médical on peut fabriquer certains accessoires en travaillant à la chaleur le verre ordinaire.

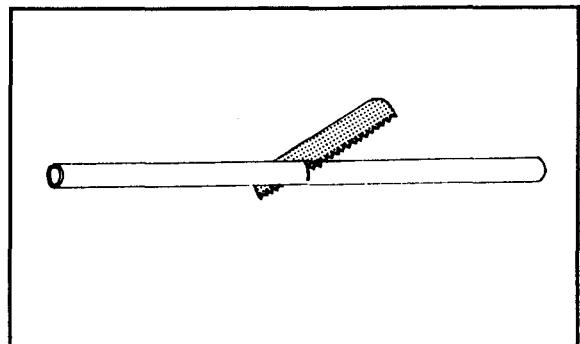
A. MATÉRIEL

1. Tubes de verre creux:
 - diamètre extérieur: 4 à 8 mm
 - épaisseur: 0,9 à 1,0 mm
2. Baguettes de verre:
 - diamètre: 4 à 8 mm
3. Coupe-tube diamant, ou limes à verre
4. Chiffon
5. Bec Bunsen (ou, mieux, petit chalumeau à gaz ou à essence).

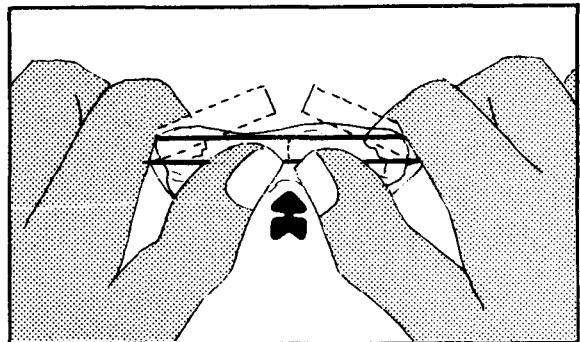


B. FABRICATION D'UNE PIPETTE PASTEUR

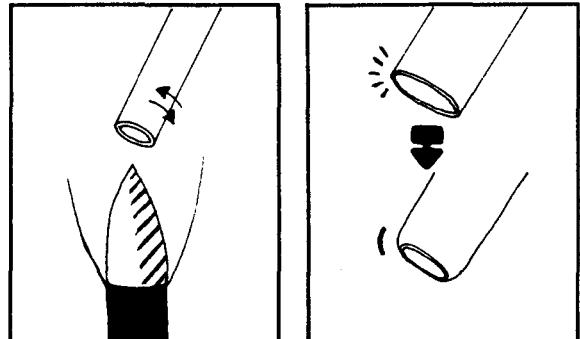
1. Utiliser des tubes de 4 à 6 mm de diamètre.
Avec une lime, préparer le découpage du tube de verre, en portions de:
 - 15 cm pour les petites pipettes
 - 18 à 25 cm pour les grandes pipettes.
Le trait de lime doit être complètement circulaire, c'est-à-dire qu'il doit entamer tout le tour du tube.



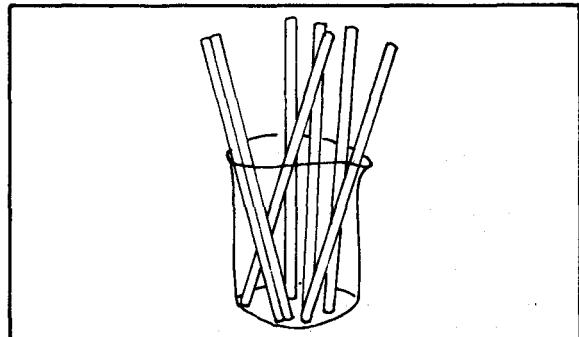
2. Entourer d'un chiffon la portion à casser.
Tenir le tube à 2 mains, chaque pouce de part et d'autre du trait de lime.
Casser en pressant avec les pouces.



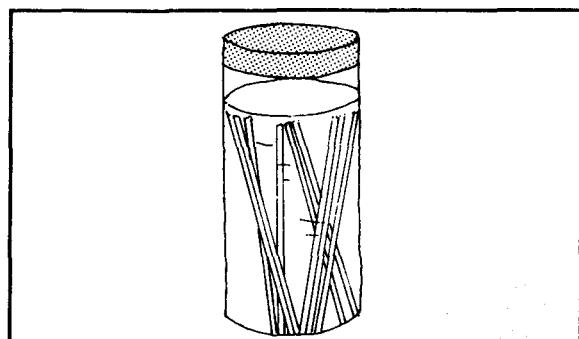
3. Arrondir les bouts de chaque morceau de tube de la façon suivante:
 - chauffer l'extrémité du tube, en position presque verticale, juste au-dessus de la flamme bleue du bec
 - tourner lentement
 - arrêter quand le verre est porté au rouge.



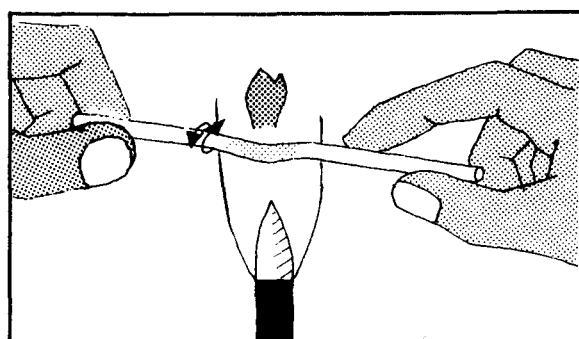
4. Laisser refroidir les pièces de tube dans un bécher ou une boîte en fer, bouts chauffés en haut.



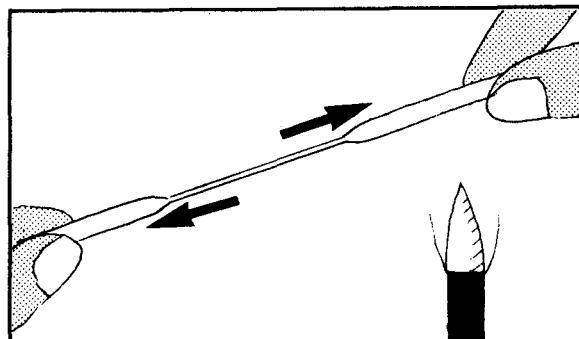
5. Laver tous les tubes préparés (en suivant les instructions figurant à la page 30).
Rincer et sécher.



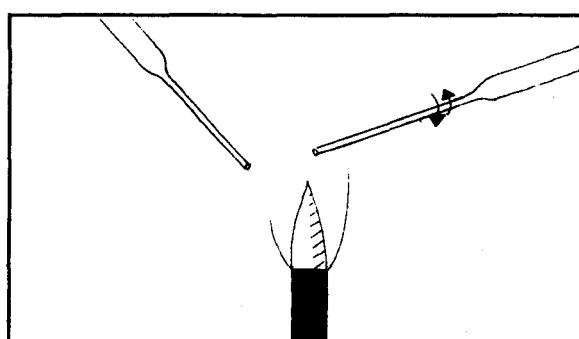
6. Pour étirer les pipettes procéder comme suit:
– chauffer le milieu du tube au-dessus de la flamme bleue
– tourner constamment jusqu'à ce que le verre prenne une teinte rougeâtre.
A cet instant, la flamme du bec vire au jaune.



7. Eloigner le tube de la flamme, tout en continuant à le tourner, écarter les mains en tirant lentement et bien droit. Le verre s'étire.
L'étirer à la longueur requise (10 à 20 cm).



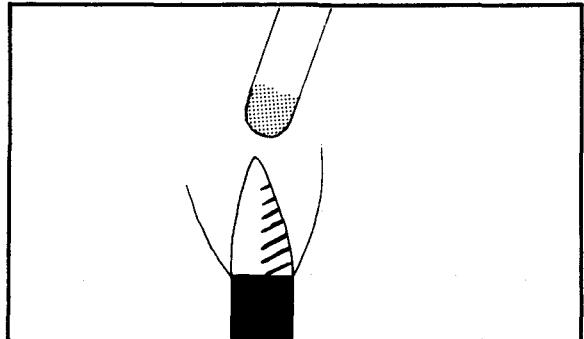
8. Laisser refroidir.
Couper exactement le tube étiré à la longueur voulue.
Arrondir le bout coupé, en le présentant quelques secondes à la flamme.
Ou séparer et sceller les 2 pipettes en chauffant à la flamme la portion étirée.



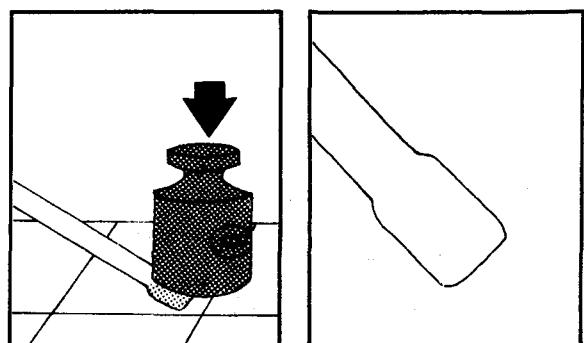
C. FABRICATION D'UN AGITATEUR

1. Utiliser des baguettes en verre plein d'environ 5 mm de diamètre.

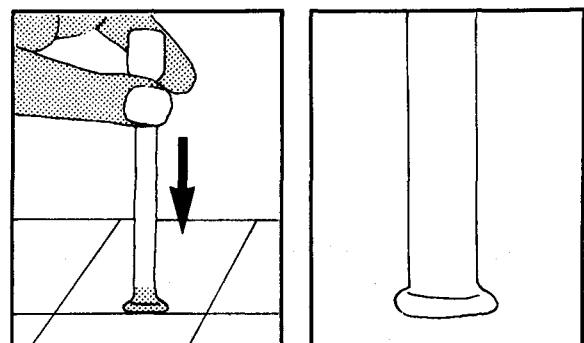
Couper la baguette en portions de 15, 20 ou 25 cm, selon les besoins, avec une lime. La méthode est la même que pour les tubes creux.



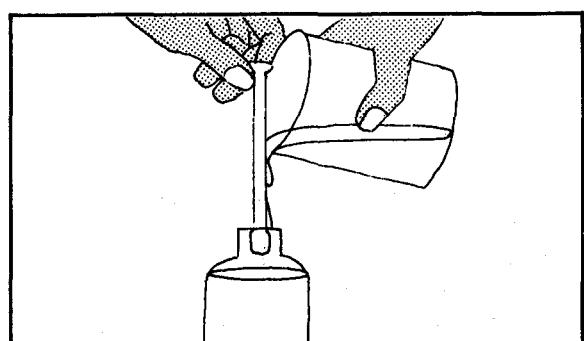
2. Arrondir les extrémités en les tournant au-dessus de la flamme bleue du bec, jusqu'à porter le verre au rouge vif sur environ 1 cm.



3. Aplatir la partie chauffée avec un poids de balance de 500 g ou de 1 kg, sur le carrelage (bien sec) de la surface de travail.



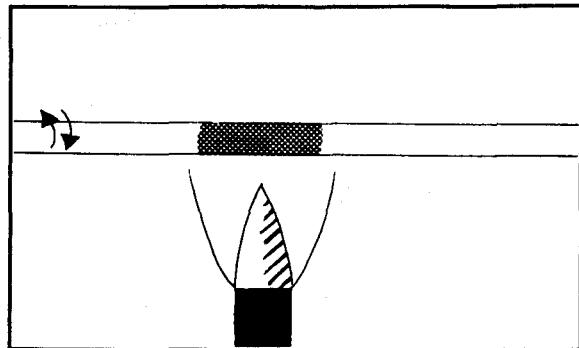
4. Chauffer l'autre extrémité et l'aplatir en appuyant légèrement sur le carrelage.



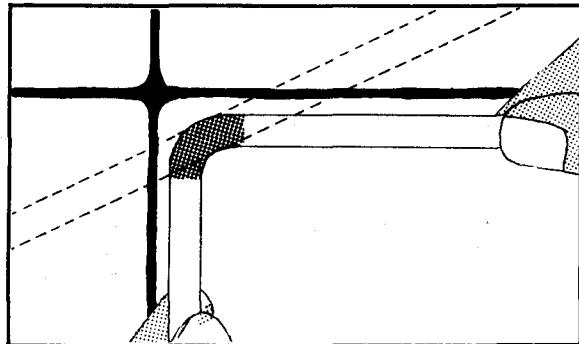
On peut utiliser les agitateurs quand on décante les liquides, ou qu'on les transvase lentement.

D. COURBURE DES TUBES DE VERRE

1. Chauffer l'endroit choisi pour la courbure, en tournant le tube au-dessus de la flamme, jusqu'à ce que le verre devienne rouge très clair et se ramollisse.

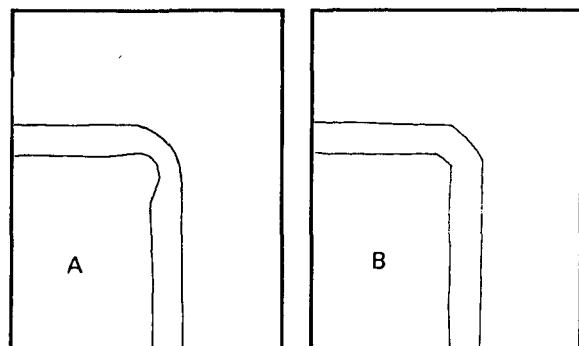


2. Courber lentement à angle droit (en suivant les angles d'un carrelage).



Mauvaises courbures

- (A) Le verre a été trop chauffé.
(B) Le verre n'a pas été assez chauffé.

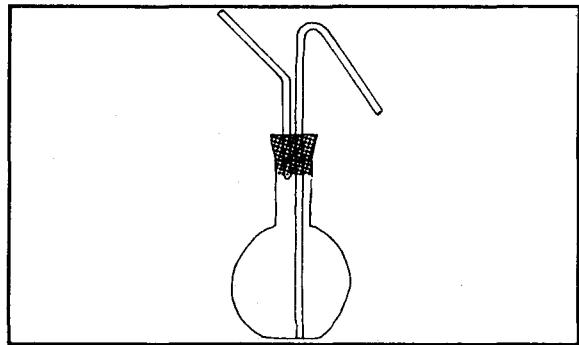


E. FABRICATION D'UNE PISSETTE EN VERRE

Il faut:

- un ballon
- deux tubes de verre
- un bouchon de liège ou de caoutchouc.

Percer les bouchons à l'aide d'une queue-de-rat. Pour introduire le tube dans le trou percé, l'humidifier d'abord avec quelques gouttes d'eau (bouchon de liège) ou de glycérine (bouchon de caoutchouc). Se protéger les mains avec un chiffon.



11. Récipients pour prélèvements

Différents types de récipients sont utilisés au laboratoire pour recueillir des prélèvements tels que selles, sang, urines ou crachats.

I. RÉCIPIENTS POUR ÉCHANTILLONS DE SELLES

Voir pages 114 et 268.

II. FLACONS ET TUBES POUR ÉCHANTILLONS DE SANG

A. Sans anticoagulant

- Utiliser des tubes propres et secs de 5 à 20 ml, selon les besoins.
- Recueillir le sérum après coagulation et centrifugation (voir page 285).
- Si le sérum doit être expédié à un autre laboratoire, stériliser tubes et flacons.

Pour réduire les manipulations au strict minimum, il est préférable d'utiliser des tubes qui se prêtent à la centrifugation.

B. Avec anticoagulant

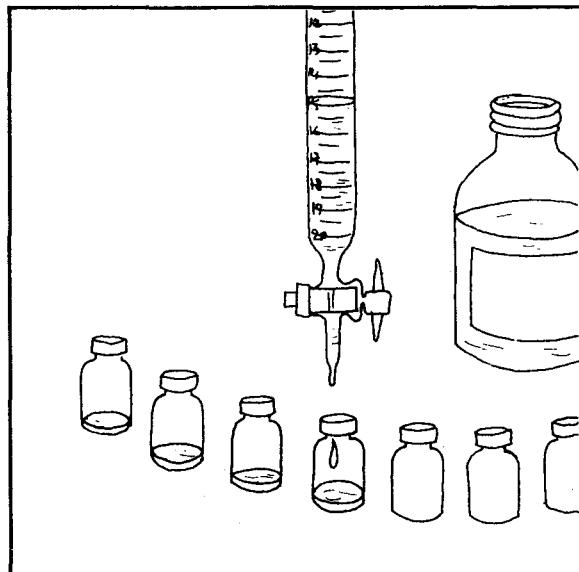
1. Anticoagulant pour l'hématologie

(a) Solution de sel dipotassique de l'acide EDTA

Verser 0,5 ml de solution (réactif No. 21) dans chaque flacon de 5 ml (ou 0,2 ml dans des flacons de 2 ml). Laisser sécher les flacons ouverts à température ambiante, ou les placer dans un incubateur à 37°C.

Utilisations:

- numération globulaire
- dosage de l'hémoglobine
- groupages sanguins.



(b) *Tubes héparinés*

L'héparine est un anticoagulant coûteux qui s'altère assez facilement dans les pays chauds. Les tubes sont généralement préparés par des firmes commerciales ou par le laboratoire central et portent une marque indiquant jusqu'à quel niveau il faut ajouter du sang.

(c) *Solution de citrate trisodique à 3,8%*

Préparation: voir réactif No. 17.

Cette solution est utilisée pour déterminer la vitesse de sédimentation érythrocytaire, à raison de 1 ml de solution de citrate pour 4 ml de sang (ou 0,4 ml pour 1,6 ml de sang).

Attention: Ne jamais effectuer de numération globulaire sur du sang citraté.

2. *Anticoagulant pour épreuves biochimiques*

On utilise généralement:

- du fluorure de sodium (NaF).

Dosage: 10 mg de poudre de fluorure pour 10 ml de sang, ou 2 mg pour 2 ml de sang.

Utilisations:

- dosage de la glycémie
- dosage de l'urée sanguine (certaines techniques seulement).

Attention: Le fluorure de sodium est un poison.

3. *Précautions à prendre pour l'utilisation des anticoagulants*

- (a) Mélanger immédiatement, dès que le sang est prélevé, en retournant le flacon doucement et régulièrement, plusieurs fois de suite. *Ne pas agiter.*
 - (b) Utiliser des flacons propres. Les sécher avant d'y verser les anticoagulants. *Attention: Des traces de détergent peuvent dissoudre les hématies.*
 - (c) Conserver les flacons contenant des anticoagulants à l'abri de l'humidité. Le sel dipotassique de l'EDTA et le fluorure de sodium sont stables à température ambiante, mais le citrate trisodique et l'héparine doivent être conservés au réfrigérateur.
 - (d) Respecter les quantités prescrites. Utiliser des flacons portant un trait de jauge, ou coller l'étiquette du flacon de manière à ce que son bord supérieur indique la hauteur du volume de sang à ajouter (2 ml, 5 ml, etc.).
-

III. FLACONS UTILISÉS POUR D'AUTRES PRÉLÈVEMENTS

Chaque fois que possible, le mieux est de faire uriner le malade au laboratoire.

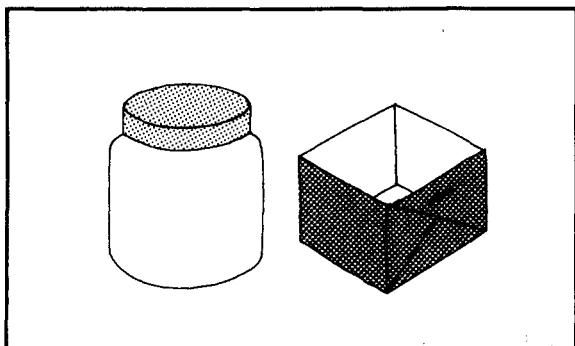
Utiliser des erlenmeyers de 250 ml ou des bouteilles à large col, propres et secs, du type employé pour les examens directs et les épreuves courantes de biochimie (voir page 305).

Pour les examens bactériologiques de l'eau, voir page 279.

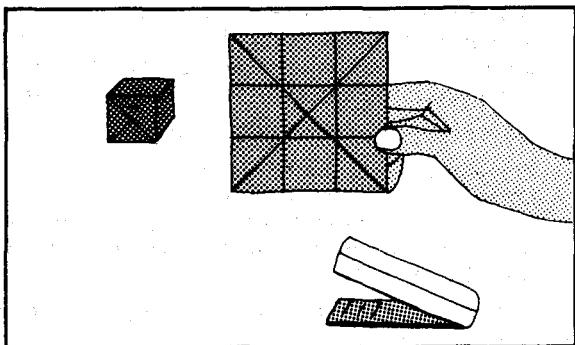
Pour les prélèvements de liquide céphalo-rachidien, voir page 350.

IV. BOÎTES ET POTS UTILISÉS POUR LES ÉCHANTILLONS DE CRACHATS

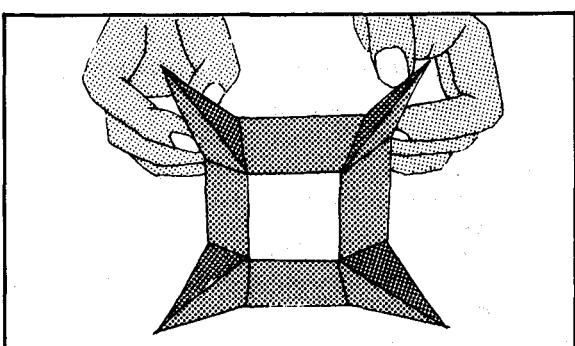
On utilise des pots en verre munis d'un couvercle à visser, des boîtes en plastique à jeter, avec couvercle, ou des boîtes en carton fabriquées au laboratoire, à l'aide de carton et une agrafeuse. Ces boîtes en carton ne peuvent être utilisées qu'une seule fois, pour des échantillons recueillis au *laboratoire même*.



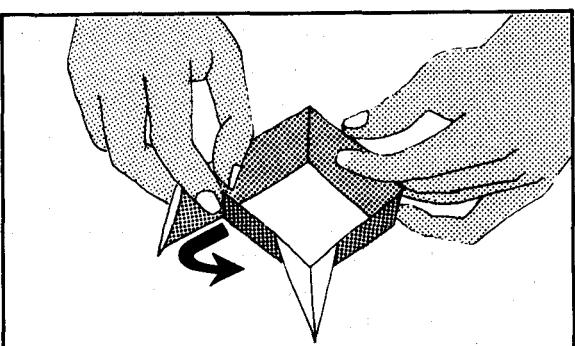
1. Préparer des carrés de carton de 18 cm de côté et les plier comme indiqué sur le schéma:
 - d'abord en diagonale
 - puis en formant 9 carrés égaux.



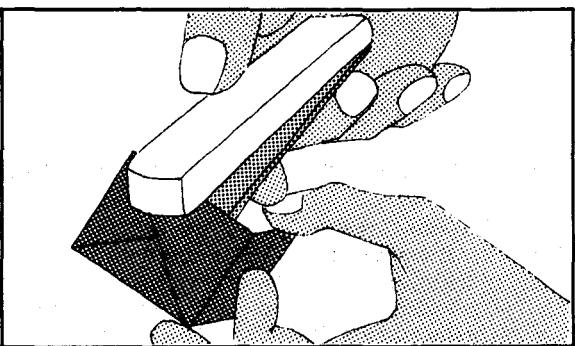
2. Marquer les pliures diagonales dans chaque carré des 4 coins, en pliant vers l'intérieur.



3. Rabattre 2 des coins pliés l'un sur l'autre d'un côté, puis les 2 autres coins pliés sur le côté opposé.



4. Agrafez de chaque côté les 2 coins rabattus. La boîte à crachats est prête.



5. Après usage, brûler boîtes en carton ou pots en plastique, comme indiqué à la page 39.

12. Expédition de prélèvements à un autre laboratoire

Le laboratoire périphérique est appelé à expédier des prélèvements au laboratoire de l'échelon supérieur ou au laboratoire spécialisé, pour des examens qui ne peuvent pas être effectués sur place. Par exemple:

- sérologie des tréponématoses ou des typhoïdes, recherche par culture du vibron cholérique dans les selles, examen histologique d'une biopsie.

Le tableau ci-dessous indique, pour chaque type de prélèvement et pour chaque examen particulier:

- le récipient et, le cas échéant, l'agent conservateur à utiliser
- la quantité à expédier
- le temps maximal de conservation.

Type d'échantillon	Examen demandé	Récipient et agent conservateur	Quantité à expédier	Délai de conservation
CRACHAT	Recherche du bacille de Koch par culture	Flacon de 45 ml avec 25 ml d'une solution à 0,6% de bromure de cétyl-pyridium (voir page 255)		10 jours
	Autres germes	Pas d'agent conservateur		2 heures
FROTTIS DE GORGE	Recherche du bacille diphtérique par culture	Tube de sérum coagulé (voir page 273) Ecouvillon de coton		24 heures 4 heures
LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN	Recherche du méningocoque par culture	Flacon spécial avec milieu "Transgrow" (voir page 350) ou milieu de Stuart LCR dans un flacon hermétique stérile, placé dans une bouteille thermos remplie d'eau à 37°C	2 ml	4 jours 24-48 heures 12 heures
	Autres germes	Flacon stérile	2 ml	2 heures
	Epreuves chimiques (glucose, protéines, chlore, etc.)	Flacon stérile	2-4 ml	2 heures
PUS URÉTHRAL	Recherche du gonocoque par culture	Voir page 245 Flacon spécial avec milieu "Transgrow" ou milieu de Stuart	1 écouvillon de pus 1 écouvillon de pus	4 jours 24 heures
PUS DIVERS	Examen bactériologique par culture	1 tube stérile	1 ml	2 heures

Type d'échantillon	Examen demandé	Récipient et agent conservateur	Quantité à expédier	Délai de conservation
SANG	Numération globulaire	Solution de sel dipotassique de l'acide EDTA (réactif No. 21)	5 ml	12 heures
	Groupage sanguin	Solution de sel dipotassique de l'acide EDTA ou tube sans anticoagulant	5 ml	12 heures
	Epreuve de compatibilité	Tube sans anticoagulant	5 ml	12 heures
	Taux de prothrombine (épreuve de Quick)	0,5 ml de solution de citrate trisodique (indiquer sur l'étiquette l'anticoagulant utilisé)	4,5 ml	2 heures
	Thrombotest	Tubes plastiques livrés avec 0,5 ml de solution de citrate trisodique (réactif No. 17)	4,5 ml	24 heures
	Sérologie: tréponématoses, salmonelloses, etc.	Tube stérile sans anticoagulant. Expédier selon le cas du sérum stérile ou des rondelles de sang séché (voir pages 285 et 287)	10 ml	3 jours
	Sérologie des infections à virus	Expédier des échantillons successifs de sérum: — sang prélevé au début de la maladie — sang prélevé après 2 à 4 semaines (pour surveiller l'augmentation des anticorps)	10 ml	3 jours
	Glycémie	5 mg de fluorure de sodium	5 ml	2 heures
	Autres examens biochimiques: bilirubine* cholestérol fer sérique lipides protides tests hépatiques urémie	Flacon sans anticoagulant Expédier le sérum	10 ml	48 heures
	Dosages d'enzymes: amylase phosphatases transaminases	Flacon sans anticoagulant	5 ml	2 heures
	Hémoculture	Ballon spécial stérile contenant 50 ml de bouillon de culture; porter à 37°C le plus rapidement possible après avoir ajouté l'échantillon	5 ml	24 heures
SELLES	Toutes cultures y compris recherche du vibron cholérique	Milieu de transport de Cary-Blair (réactif No. 14)		4 semaines
	Toutes cultures autres que recherche du vibron cholérique	Soluté salin tamponné glycériné (réactif No. 33)		2 semaines
	Recherche d'œufs, larves et kystes de parasites	Flacon de 30 ml contenant 15 ml de formol à 10% (réactif No. 26)	environ 5 ml	pratiquement indéfini

* Pour la recherche de bilirubine, conserver le prélèvement à l'abri de la lumière.

Type d'échantillon	Examen demandé	Récipient et agent conservateur	Quantité à expédier	Délai de conservation
SELLES (suite)	Amibes: formes végétatives	Tube de 10 ml contenant 5 ml de MIF (réactif No. 41) ou de PVA (voir pages 173 et 174)		pratiquement indéfini
URINES	Analyses biochimiques: glucose, protéines, acétone, etc.	Flacon propre et sec (scellé)	20 à 50 ml (selon le nombre d'examens à effectuer)	2 heures
	Sédiments urinaires	Flacon propre et sec ou flacon contenant 8 gouttes de formol à 10% (réactif No. 26)	30 ml 30 ml	2 heures 2 jours
	Oeufs de schistosomes	Pour concentration: 2 ml d'eau de Javel et 1 ml d'acide chlorhydrique	100 ml	pratiquement indéfini
	Examen bactériologique par culture	Flacon stérile	20 ml	1 heure
	Test de grossesse	Flacon stérile	20 ml (urine du réveil)	12 à 24 heures (ou 4 jours au réfrigérateur)
	Dosages hormonaux	Flacon avec agent conservateur fourni par le laboratoire de biochimie: respecter les indications concernant l'obtention de l'échantillon, les quantités nécessaires et les délais d'expédition.		
BIOPSIE	Examen histologique	Voir détails page 75 On utilise des fixateurs: — formol salin (réactif No. 28) — fixateur de Zenker (réactif No. 61)		
CHEVEUX, ONGLES, SQUAMES CUTANÉS	Recherche de champignons (mycoses)	Enveloppes de papier ou flacon avec bouchon à visser (ne pas utiliser de tubes avec bouchons de coton ou de caoutchouc)		1 semaine au moins (parfois davantage)

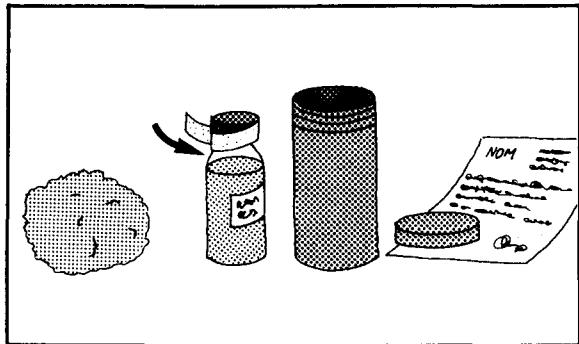
EMBALLAGES

Dans tous les cas, respecter les règlements en vigueur dans le pays.

Utiliser un double emballage.

Le flacon ou le tube de verre contenant le prélèvement sera bouché bien hermétiquement (sceller le couvercle ou le bouchon avec du sparadrap).

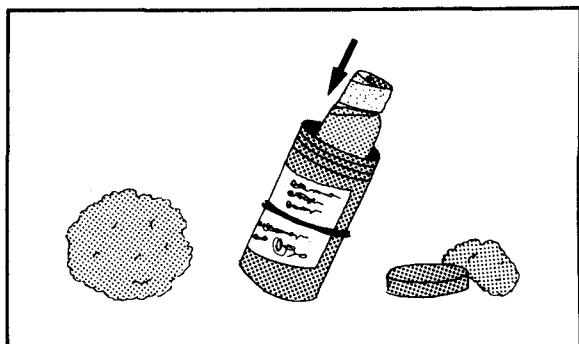
Vérifier que le flacon porte une étiquette au nom du malade.



Placer le flacon scellé dans un tube métallique en aluminium, avec couvercle à visser, et le caler avec un peu de coton cardé.

Fixer la fiche de renseignements autour du tube métallique. Elle portera les indications suivantes:

- NOM (en majuscules), prénom, sexe, âge du malade
- nature du prélèvement
- examen de laboratoire demandé (diagnostic du médecin, le cas échéant).



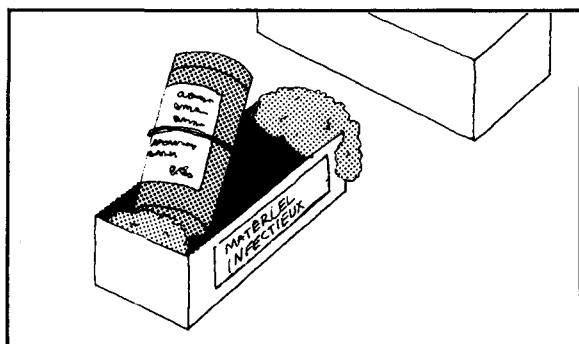
Placer le tube métallique dans une boîte en carton fort ou en bois pour expédition. Bien caler avec du coton cardé.

Sur l'étiquette extérieure du colis, ajouter les mentions:

URGENT FRAGILE

et, le cas échéant,

MATÉRIEL INFECTIEUX



13. Fixation et envoi de biopsies pour l'anatomo-pathologie

Biopsie

Pour diagnostiquer certaines maladies organiques, le médecin préleve un fragment de tissu à l'aide de pinces ou d'un bistouri spécial. Ce fragment est appelé *une biopsie*. Il sera soumis à un examen microscopique après découpage en tranche mince et coloration spéciale.

Histologie – Anatomo-pathologie

Au microscope, on peut observer les cellules des biopsies de ces tissus et organes. Cette étude microscopique est *l'histologie*.

L'anatomo-pathologie étudie les altérations et les malformations de ces cellules dans les différentes maladies. Ces examens peuvent être importants, en particulier pour le diagnostic du cancer.

Le technicien de laboratoire doit être capable de procéder à *la fixation des biopsies*, pour en assurer l'envoi en bon état au laboratoire d'anatomo-pathologie.

A. FIXATION DES BIOPSIES

Le fragment de tissu prélevé est immergé dans un liquide fixateur. Ce traitement doit permettre la conservation du tissu, dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, en le protégeant contre les attaques bactériennes, l'autolyse, les rétractions, etc.

Le type de récipient le plus commode est un flacon bouché d'une capsule plastique, à large ouverture (pilulier). On trouve des flacons de 60, 45, 30 et 15 ml.

Liquides fixateurs

Les plus simples à préparer sont:

- le formol salin (réactif No. 28)
- le fixateur de Zenker (réactif No. 61). A ajouter, juste avant l'emploi, 5 ml d'acide acétique glacial pour 100 ml de fixateur.

B. TECHNIQUE DE FIXATION

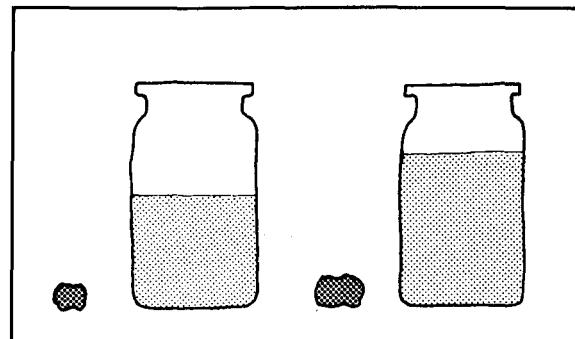
1. Mesure du volume du fixateur

Le volume du liquide fixateur doit être environ 50 fois celui de la biopsie. Les biopsies ont en moyenne 3 à 5 mm d'épaisseur (si elles sont plus épaisses, leur fixation sera difficile, voire impossible).

Leur surface peut, par contre, avoir une taille variable qui conditionne la quantité de fixateur à utiliser:

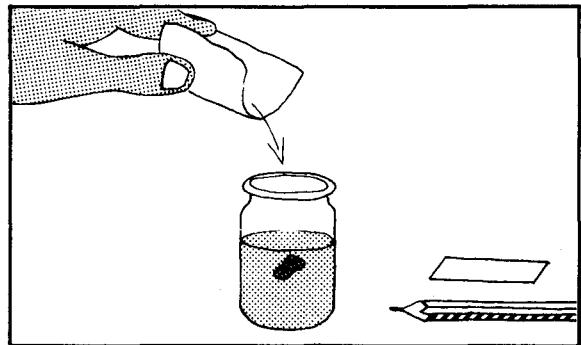
Quantité de fixateur à utiliser:

- biopsie de 0,5 x 0,5 cm: 6 à 10 ml
- biopsie de 0,5 x 1 cm: 10 à 15 ml
- biopsie de 1 x 1 cm: 20 à 25 ml
- biopsie de 2 x 1 cm: 30 à 40 ml
- biopsie de 2 x 2 cm: 90 ml.



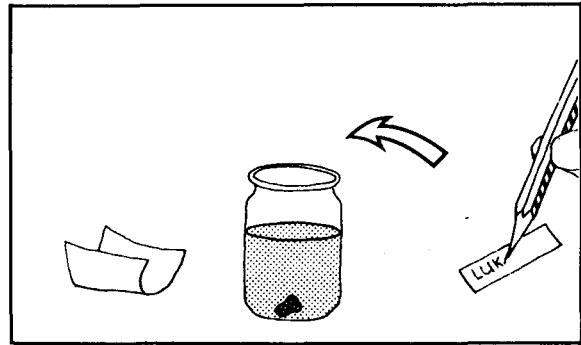
2. Préparation

Il faut opérer vite, dès réception de la biopsie.
Ne jamais attendre.
Le liquide fixateur est mis en premier dans le flacon.
Prendre la biopsie à l'aide d'un morceau de bristol souple (ne pas utiliser de pinces qui pourraient la léser).
La faire tomber dans le liquide du flacon.



3. Etiquetage

Découper un petit rectangle de bristol (environ 3 x 1 cm). Y inscrire *au crayon* (à mine de plomb) le nom du malade, la date de la biopsie, etc. Placer l'étiquette dans le flacon contenant le liquide fixateur.



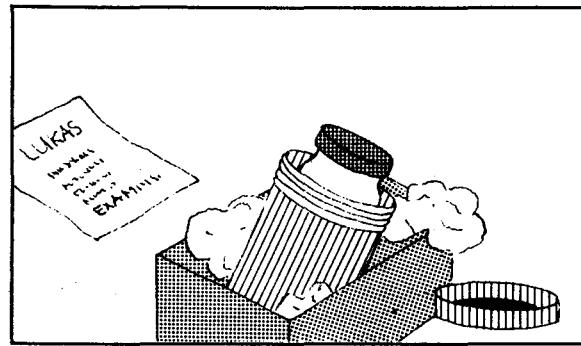
4. Durée de la fixation

Elle varie selon les liquides fixateurs. Pour les 2 liquides indiqués ici, prévoir un délai de 24 à 48 heures avant de couper et colorer, mais la biopsie peut rester au moins 8 jours dans le fixateur.



5. Expédition

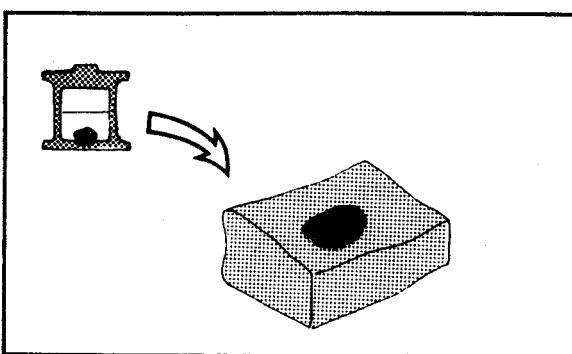
Fixer la capsule plastique ou le bouchon au flacon avec du sparadrap.
Placer le flacon dans un tube ou étui métallique avec la fiche de renseignements (nom, date, maladie suspectée, nature de la biopsie, recherche demandée).
Placer le tout dans une petite boîte en bois ou en carton, calé avec du coton cardé et expédier aussitôt.
Il est bon d'expédier le flacon sans délai au laboratoire d'anatomopathologie, mais une longue période d'attente n'entraînerait pas de détérioration de la biopsie.



C. TECHNIQUE DES EXAMENS HISTOLOGIQUES: SCHÉMA GÉNÉRAL

1. *Fixation de la biopsie: voir ci-dessus, page 75*
2. *Inclusion de la biopsie*

Après une série de traitements par différents liquides pour le déshydrater et l'éclaircir, le morceau de tissu est enrobé dans un bloc de matière solide (paraffine).

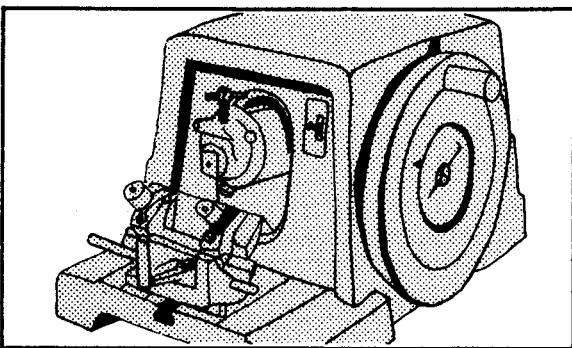


3. *Coupe*

Le bloc renfermant la biopsie est découpé en tranches minces (suffisamment fines pour pouvoir être examinées au microscope).

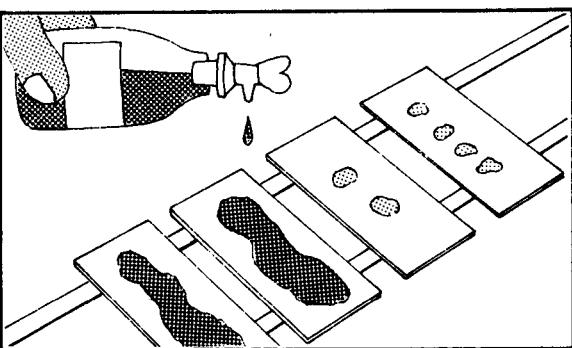
Le "Microtome" est l'appareil qui sert à faire ces coupes minces; il fonctionne un peu comme une machine à couper le jambon.

L'épaisseur moyenne des coupes doit être de 3 à 5 µm (micromètres).



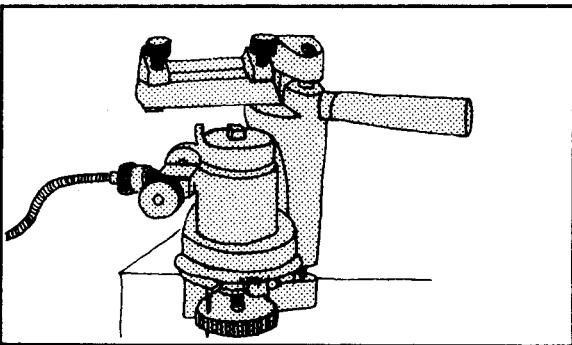
4. *Coloration*

Les coupes sont déposées sur des lames, elles sont alors séchées, débarrassées de la paraffine, à l'aide d'un solvant (xylène, p. ex.) déshydratées, puis colorées. Il y a différents types de colorations parmi lesquels le spécialiste choisit en fonction du tissu prélevé et de la maladie soupçonnée.



5. *Autre procédé: congélation*

Pour un diagnostic rapide, la biopsie est traitée par un microtome à gaz liquide qui congèle la biopsie fraîche, non fixée, et la découpe aussitôt. Ce procédé est utilisé au cours d'interventions chirurgicales.



Envoi d'un organe ou d'une tumeur

On utilise les mêmes fixateurs. Immerger complètement l'organe ou la tumeur opérée dans un grand flacon plein de fixateur.

14. Inscription des prélèvements; registres du laboratoire et rapports mensuels

Il faut enregistrer et numérotier tous les prélèvements dès leur arrivée au laboratoire, et consigner tous les résultats d'analyses, et cela pour:

- éviter tout risque de confusion entre les échantillons
- permettre de retrouver un résultat
- permettre l'utilisation des résultats pour la promotion de la santé.

Le laboratoire doit posséder:

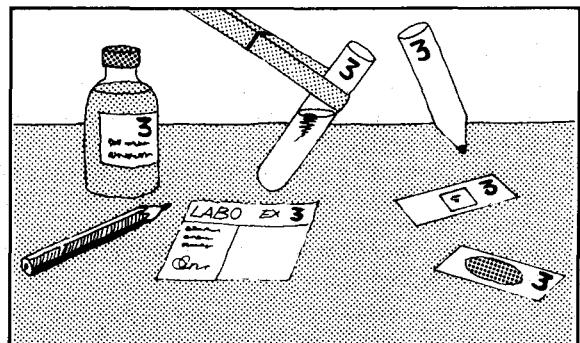
- des bulletins de demandes d'analyse qui accompagnent les prélèvements
- des registres de laboratoire où seront consignés les détails concernant les prélèvements ainsi que les résultats obtenus
- des fiches pour rapports mensuels.

A. NUMÉROTAGE DES PRÉLÈVEMENTS

Dès sa réception, chaque prélèvement reçoit un numéro d'ordre. L'inscrire immédiatement:

- sur le bulletin de demande d'analyse
- sur le flacon de prélèvement (au crayon gras)
- sur chaque tube utilisé pour ce prélèvement
- sur chaque lame d'examen microscopique utilisée pour ce même prélèvement.

On évitera ainsi tout risque d'erreur.



B. REGISTRES DE LABORATOIRE

Ils consistent en une série de cahiers à reliure cartonnée forte, aux pages numérotées. Chaque échantillon doit recevoir un numéro d'ordre et être inscrit dans le registre prévu pour le type de prélèvement en question.

Il est suggéré de prévoir les registres suivants:

- Hématologie
- Chimie sanguine
- Transfusions sanguines
- Donneurs de sang
- Parasitologie
- Analyses d'urines, LCR, épreuves de grossesse
- Bactériologie, mycologie, analyses de l'eau
- Sérologie (si les échantillons sont peu nombreux, les inscrire dans le registre "Bactériologie", sinon prévoir un registre distinct).

Les exemples figurant aux pages suivantes seront adaptés aux besoins. Ainsi, il peut être nécessaire de tenir des registres séparés pour les analyses d'urines, le LCR et les épreuves de grossesse.

On gagnera du temps si l'on possède des tampons en caoutchouc pour les épreuves et résultats les plus courants. Par exemple:

Epreuve du VDRL: NÉGATIF

Parasitologie: NOMBRE D'ŒUFS OU DE PARASITES OBSERVÉS _____

Bactériologie: NOMBRE DE LEUCOCYTES _____

NOMBRE D'ÉRYTHROCYTES _____

NOMBRE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES _____

NOMBRE ET TYPE DE MICRO-ORGANISMES _____

HÉMATOLOGIE*

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Hb ^a (g/l)	Erythrocytes				Réticulocytes Fraction de nombre ^b (x 10 ⁻³)	Hb: Conc. érythroc. moyenne (g/l) ^c	Leucocytes					Paludisme	Autres examens	Résultats communiqués le			
					Fraction de vol.	Vitesse de séd. (mn/h)	Concentr. de nbre (x 10 ⁻¹² /l)	Morphologie			Conc. nbre (x 10 ⁹ /l)	Formule leuc.: frac. de nbre									
					Neut.	Lymph.	Mon.	Eos.			Autres										
1 jan	1	Mw... R	Dr R	117	—	23	—	Aniso++ Poik + Poly ++	124	—	4,2	0,48	0,35	0,13	0,04	Nbreux <i>P falciparum</i> (troph.)		1 jan			
1 jan	2	Ka... S	Cons.H	58	0,21	52	—	Aniso ++ Poik ++ Hypo ++ Poly +	71	276	5,7	0,32	0,56	0,04	0,08	Un certain nb de <i>P.falc.</i> (troph.)		1 jan			
1 jan	3	Ki... A	Méd. 1	125	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			1 jan			

* Pour l'explication des différentes rubriques, se reporter aux chapitres correspondants. Faute de place on a abrégé un certain nombre de termes, mais cela ne signifie pas qu'il faille systématiquement recourir aux abréviations dans la pratique.

^a Les chiffres obtenus pour l'hémoglobine peuvent également être consignés sous forme de concentration de quantité de matière. La rubrique s'intitulera alors "Hb(Fe) (mmol/l)". Dans ce cas, les chiffres des exemples 1 et 2 seraient respectivement de 7,3 et 3,6.

^b La quantité de réticulocytes est ici exprimée en fraction de nombre. On pourrait utiliser la concentration de nombre, c'est-à-dire le nombre/l. La rubrique s'intitulerait alors "Réticulocytes: concentration de nombre (x 10⁹/l)" et les chiffres seraient fonction des concentrations de nombre trouvées pour les erythrocytes (qui ne sont pas indiquées dans le présent modèle).

^c La concentration globulaire moyenne peut aussi s'exprimer en concentration de quantité de matière. La rubrique s'intitulerait alors: "Concentration moyenne érythrocytaire, Hb(Fe) (mmol/l)", et la valeur serait de 17,1 pour l'exemple cité.

CHIMIE SANGUINE

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Urée (mmol/l)	Glucose (mmol/l)	Autres examens	Résultats communiqués le
1 jan	1	Ki... A	Méd. 1	12,8	—		1 jan
1 jan	2	Mw... A	Dr G	—	5,3		1 jan

TRANSFUSION SANGUINE

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Groupe sanguin du malade							Groupe ABO Rhésus	
				Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D	A	B	O		
1 jan	1	CH ... P	Méd. 6	+	-	+	+	-	+	-	A pos.	
1 jan	2	MW ... A	Méd. 3	-	+	+	+	+	-	-	B pos.	
1 jan	3	KI ... T	Méd. 2	-	-	-	+	+	+	-	O pos.	
1 jan	4	SI ... P	Méd. 6	+	+	+	+	-	-	-	AB pos.	

ANALYSES D'URINES

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Densité relative	pH	Examen direct	
1 jan	1	MO ... C	Dr R	1,008	7,0	Leuco 20-30/ch. fort gr. Qq cylindres hyalins	
1 jan	2	LA ... B	Méd. 2	1,012	6,8	Leuco 5-10/ch. fort gr. Qques cellules épithél.	

EXAMEN DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN (Registre des analyses d'urines ou registre distinct)

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Aspect macroscopique	Examen microscopique direct	
2 jan	1	FE ... W	Dr G	Trouble	Gram: nombreux leucocytes Quelques diplocoques intracellulaires Gram-négatifs	
17 jan	2	LE ... E	Dr C	Clair		

Groupe du donneur	No. flacon donneur	Compatib. quantité testée	Epreuve de compatibilité				Hémolysines (donneurs O)	Signature
			Sol. phys.	Album.	Sol. phys. (auto)	Album. (auto)		
A pos.	5	540 ml	—	—	—	—		
B pos.	9	250 ml	—	—	—	—		
O pos.	4	540 ml	—	—	—	—		
O pos.	7	540 ml	—	—	—	—	Anti-A: pas d'hémol. Anti-B: pas d'hémol.	

Glucose	Prot.	Pigments biliaires	Urobil	Cétones	Recherche chimique de sang	Divers (grossesse, etc.)	Résultats communiqués le
Nég.	Nég.	—	—	—	—	—	1 jan
+++	Nég.	—	—	+	—	pos.	1 jan

Leucocytes ($\times 10^9/l$)	Glucose (mmol/l)	Protéines totales (g/l)	Globulines: réaction de Pandy	Divers	Résultats communiqués le
30	1,5	0,45	+	Neutrophiles 0,94 Lymphocytes 0,06	2 jan
4	3,3	0,25	nég.	—	17 jan

REGISTRE DES DONNEURS DE SANG (petit cahier ligné)

Date	Nom du donneur	Groupe sanguin	Hémoglobine (g/l)	Numéro du donneur
1 janvier	DO ...M	A pos.	141	1
2 janvier	LO ...F	A pos.	132	2
2 janvier	FE ...W	B pos.	129	3
4 janvier	CH ...A	O pos.	133	4

BACTÉRIOLOGIE

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Echantillon	Examen demandé	Résultats	Résultats communiqués le
1 janvier	1	AL ...J	Dr R	Crachat	Recherche bacille de Koch	Pas de bacilles acido-résistants	1 jan
1 janvier	2	RE ...A	Méd. 2	Pus de blessure	Coloration Gram	Nbreux leucocytes, qq érythr., qq cell. épithéliales, nbre moyen de bactéries Gram-négatives	1 jan
1 janvier	3	TO ...L	Dr M	Pus urétral	Coloration Gram	Nb moyen diplocoques intracell. Gram-nég.	1 jan
2 janvier	4	Puits au lieu-dit X	Agent sanitaire R B	Eau	Bactériologie	Transmis au laboratoire régional de la santé publique	2 jan
2 janvier	5	AM ...C	Dr B	Crachat	Recherche bacille de Koch	Pas vu de bacilles acido-résistants	2 jan
3 janvier	6	LA ...R	Méd. 1	Liquide céph.-rach.	Coloration Gram	Rares leucocytes, pas d'érythr.; rares cell. épith. pas vu de micro-org.	3 jan

PARASITOLOGIE

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Echantillon	Examen demandé	Résultats	Résultats communiqués le
1 jan	1	CR ...M	Dr A	Selles	Parasites	Ex. dir.: nb moyen d'oeufs d' <i>Ascaris lumbricoides</i>	1 jan
1 jan	2	RA ...B	Dr C	Selles	Parasites	Ex. dir.: pas vu d'oeufs ou de parasites Après conc.: pas vu d'oeufs ou de parasites	1 jan
2 jan	3	NE ...L	Méd. 1	Peau	Oncho	Pas vu de parasites	2 jan
2 jan	4	MO ...T	Dr R	Selles	Parasites	Sang occ.: pos. Nbreux troph. de <i>E. histolytica</i> . Quelques œufs d'ankylostomes	2 jan

SÉROLOGIE

Date	No.	Nom du malade	Envoyé par	Echantillon	Examen demandé	Résultats	Résultats communiqués le
1 jan	1	LA ...P	Cons. prénat.	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
1 jan	2	RO ...M	Cons. prénat.	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
1 jan	3	ME ...R	Cons. prénat.	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
1 jan	4	LE ...T	Cons. prénat.	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
1 jan	5	BI ...N	Dr M	Sang	VDRL	Réactif, 1:8	1 jan
1 jan	6	ST ...C	Dr L	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
1 jan	7	HA ...J	Dr A	Sang	VDRL	Non réactif	1 jan
4 jan	8	MA ...S	Cons. prénat.	Sang	VDRL	Non réactif	4 jan

C. RAPPORT MENSUEL

A la fin de chaque mois, le laboratoire devrait soumettre un rapport mensuel au directeur des services de laboratoire, à l'échelon central, ou, à défaut, au département de la santé publique, tant à l'échelon provincial ou départemental que central.

Intérêt de ce rapport:

- (a) Aider les responsables à suivre les activités du laboratoire et à prévoir le personnel nécessaire, à commander les réserves auprès des magasins centraux et à établir le budget des services de laboratoire à l'échelon national. Ce sont les rapports faisant état du nombre d'épreuves effectuées qui répondent le mieux aux besoins de la gestion du laboratoire.
- (b) Contribuer à la surveillance de la santé publique dans la région desservie par le laboratoire, étant donné qu'il indique le nombre de résultats positifs correspondant aux différentes maladies transmissibles.

On trouvera ci-après un modèle de rapport mensuel.

LABORATOIRE
MOIS

LABORATOIRE

1. Nombre d'examens effectués

Hématologie générale	1235
Chimie sanguine	27
Donneurs de sang	34
Service de transfusions sanguines	38
Analyses d'urines:	
examen direct	287
chimie	43
Epreuves de grossesses	17
LCR:	
examen direct	3
chimie	3
Parasitologie:	
selles	162
sang	802
divers	2 (ganglions lymphatiques trypanosomes)
Bactériologie:	
coloration de Gram	63
coloration A-F	41
coloration de Wayson	11
mycologie	3
Sérologie:	
VDRL: épreuve qualitative	114
épreuve quantitative	16

2. Nombre d'échantillons expédiés aux laboratoires spécialisés

Eau pour analyses bactériologiques	8
Echantillons pour cultures	32
Sérum pour sérologie	0
Biopsies	2
Divers	0

MALADIES TRANSMISSIBLES*

Nbre de cas positifs

1. Bactériologie

Blennorragie	11
Lèpre	0
Peste	0
Tuberculose	7

2. Parasitologie

Amibiase	14
Ankylostomiasis	22
Ascaridiose	1
Filariose	80
Onchocercose	0
Paludisme	253
Schistosomiasis	2

* La liste des maladies à déclaration obligatoire varie d'un pays à l'autre. Elle est dressée par l'autorité centrale de santé publique, compte tenu des deux éléments suivants:

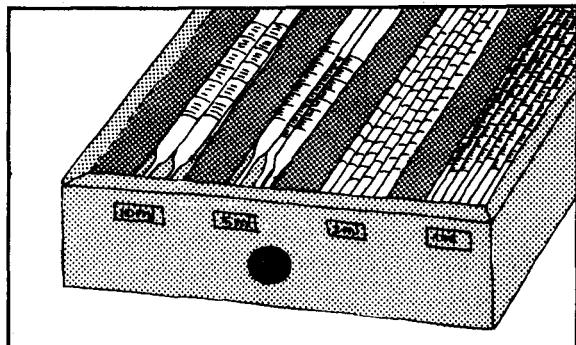
- (a) règlements internationaux régissant les maladies soumises à déclaration
- (b) maladies spécialement fréquentes dans la région considérée.

15. Rangement, inventaire, commande de fournitures

A. RANGEMENT

1. Verrerie

Garder les récipients en verre à l'abri de la poussière, sur les rayons d'une armoire. Les erlenmeyers et les ballons doivent être bouchés avec du coton cardé ou recouverts de papier brun (ou, mieux, d'une fine couche de paraffine ou de plastique adhésif, type Parafilm ou Saran). Ils seront classés par catégorie et par capacité. Ranger les pipettes graduées dans des tiroirs munis de séparations.



2. Produits chimiques et réactifs

Les classer *rigoureusement par ordre alphabétique*, comme indiqué à la page 465.

Acides et produits inflammables et dangereux (signalés par des étiquettes d'une couleur appropriée) seront conservés à part, dans un local distinct. Les flacons en réserve peuvent être stockés dans des caisses remplies de sciure de bois.

Les poisons (également signalés par des étiquettes d'une couleur appropriée) seront conservés à part, dans une armoire fermée à clé.

3. Matériel lourd

Dans les pays chauds et humides, certains appareils (comme les spectrophotomètres) peuvent être rangés dans une pièce climatisée. Pour le rangement des microscopes, voir pages 24 et 25.

B. TENUE DES STOCKS ET INVENTAIRE

1. Fiche de stock

Chaque produit chimique, chaque colorant, chaque article en verre doit faire l'objet d'une fiche de stock dont voici un modèle:

FICHE DE STOCK

Article: Giemsa (flacon de 250 ml)

Article No. 24

PROVENANCE	COMMANDE		ENTRÉE		SORTIE		EN STOCK
	Date	Quantité	Date	Quantité	Date	Quantité	
							2 flacons
	1 mai	2 flacons	20 mai	1 flacon			3 flacons
					10 juillet	1 flacon	2 flacons
					3 septembre	1 flacon	1 flacon
	15 juin	2 flacons	10 sept.	2 flacons			3 flacons

Dès qu'on commande un article, on indique:

- dans la colonne "Provenance"
- dans la colonne "Commande"
- où a été adressée la commande
- la date et l'importance de la commande.

Lorsqu'on reçoit un article, on indique:

- dans la colonne "Entrée"
- dans la colonne "En stock"
- la date de réception et la quantité reçue
- le montant total en stock au laboratoire, après arrivage.

Lorsqu'un article a été utilisé (ou cassé), on indique:

- dans la colonne "Sortie"
- dans la colonne "En stock"
- la date et la quantité utilisée (ou cassée)
- le montant total restant en stock, après cette sortie.

Ranger les fiches de stock, rigoureusement par ordre alphabétique, dans une boîte ou un classeur. On peut donner à chaque produit ou accessoire un numéro d'ordre dans la fiche qui figurera sous "Article No."

2. Inventaire

Tous les six mois, dresser un inventaire de toutes les fournitures du laboratoire. Compter la quantité disponible pour chaque article et s'assurer que ce chiffre correspond bien à celui qui figure sur les fiches à la colonne "En stock".

C. COMMANDES

Un laboratoire bien organisé passe une commande au Service central de fournitures tous les trois mois. Pour passer la commande, consulter une à une les fiches de stock.

L'estimation des quantités à commander est facilitée si l'on porte en bas de chaque fiche de stock le petit tableau suivant:

QUANTITÉ UTILISÉE PAR MOIS	Jan.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
19 ...												
19 ...												
19 ...												

Pour les produits chimiques, colorants ou réactifs, commander la quantité utilisée en 3 mois, en tenant compte d'une éventuelle augmentation ou diminution récente de la consommation. Par exemple:

- on a utilisé en un an 8 flacons de Giemsa
- soit une moyenne de 2 flacons en 3 mois
- commander 2 flacons tous les 3 mois (ou 4 flacons tous les 6 mois, si les commandes se font 2 fois par an).

Produits à date limite

Certains réactifs (sérum-tests pour groupages sanguins, antigènes, VDRL, etc.) comportent des dates limites d'utilisation. Mentionner cette date sur la fiche de stock.

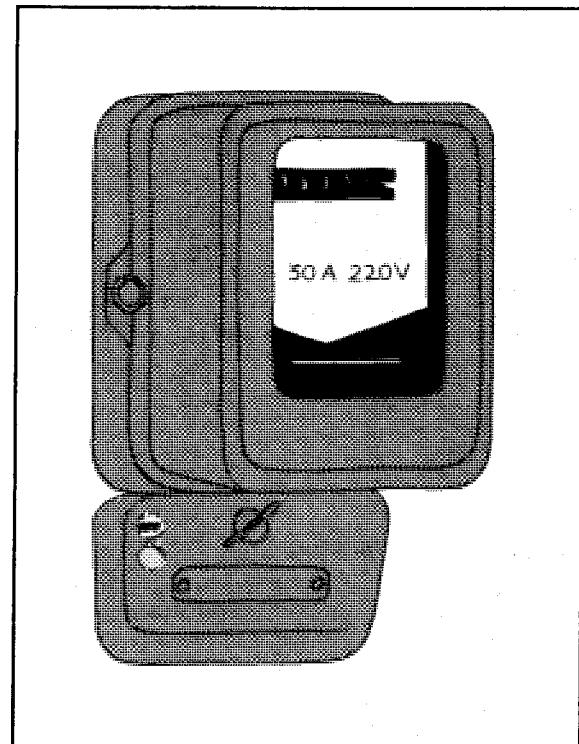
16. Électricité : Montages électriques simples

Il n'est pas absolument indispensable qu'un laboratoire périphérique soit raccordé à un réseau électrique, presque tous les examens inclus dans ce Manuel pouvant être effectués à l'aide de matériel fonctionnant sur piles ou au gaz. Une installation électrique permettra cependant d'envisager l'acquisition de matériel utile tel que:

- lampe électrique pour éclairer le microscope (son réglage se trouvera facilité par une source de lumière stable)
- centrifugeur électrique (beaucoup plus rapide que le centrifugeur à main)
- centrifugeur pour micro-hématocrite (permettant de dépister rapidement les anémies)
- spectrophotomètre ou colorimètre (dosage de l'hémoglobine beaucoup plus précis)
- stérilisateur électrique, bain-marie, etc.

On pourra être amené à faire quelques montages ou quelques réparations courantes au laboratoire. Les explications données ci-après, destinées à aider les techniciens de laboratoire à cet égard, se limitent à un exposé de la marche à suivre dans chaque cas. Il est conseillé aux débutants de s'entraîner à effectuer leurs premiers travaux en présence d'un instructeur.

NOTE: Dans bien des pays, le matériel électrique diffère de celui dont il est question ici et qui ne constitue qu'un exemple visant à illustrer des principes fondamentaux.



COMPTEUR ÉLECTRIQUE

Il sert à mesurer la consommation d'électricité. Il porte en particulier les indications des valeurs suivantes:

- la tension — mesurée en volts (220 V, 110 V, etc.)
- l'intensité — mesurée en ampères (A)
- le nombre de périodes du courant fourni: par exemple 50 hertz (Hz) (cycles par seconde).

Certains modèles de compteur comportent:

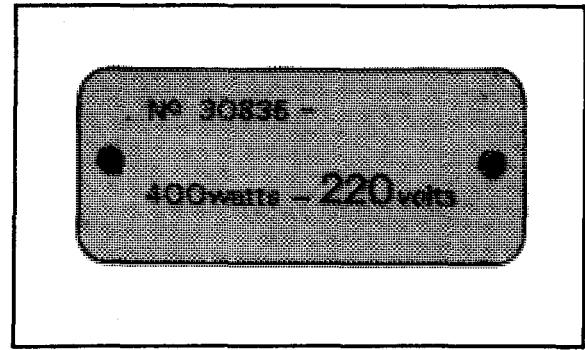
- un bouton rouge marqué "OFF" ou un interrupteur qui permet de couper le courant dans tout le bâtiment
- un bouton vert ou un interrupteur qui permet de rétablir ensuite le courant.

Le bouton "OFF" peut faire office de disjoncteur et couper automatiquement le courant quand le circuit est surchargé. Pour rétablir le courant, il faut appuyer sur le bouton vert ou manœuvrer l'interrupteur, après avoir déterminé la cause de la surcharge et y avoir remédié.

A. MISE EN MARCHE D'UN NOUVEL APPAREIL

1. Tension d'utilisation

Vérifier que la tension d'utilisation prévue par le fabricant est bien celle de votre installation.
L'appareil porte une plaque où est indiquée la tension d'utilisation. La tension de votre installation est inscrite sur le compteur.



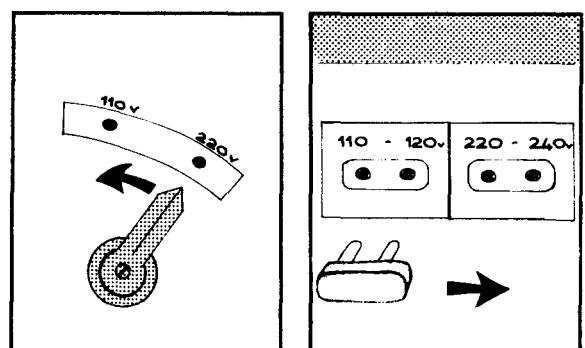
2. Appareil fonctionnant sous deux tensions

Certains appareils peuvent fonctionner sous deux tensions différentes.

En ce cas, ils comportent un petit dispositif qui permet de les mettre en position de fonctionnement sous la bonne tension, c'est-à-dire celle indiquée par le compteur.

Ce dispositif, selon le cas, peut être:

- (a) un levier à fixer sur le cran 110 V ou sur le cran 220 V, etc.
- (b) une fiche à placer dans les trous 110 V, 220 V, etc.
- (c) une vis à tourner dans la position 110 V ou 220 V, etc.



3. Puissance de l'appareil

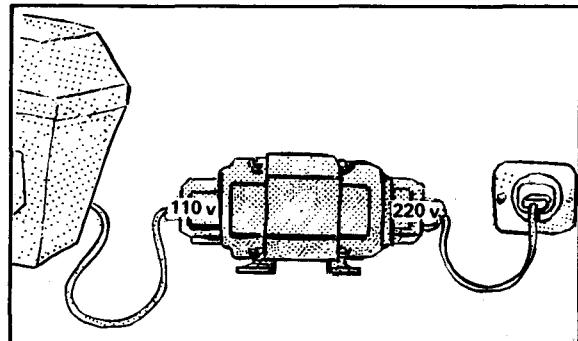
Elle se mesure en watts (W) et est indiquée sur la plaque de l'appareil à côté de la tension. Chaque appareil de laboratoire consomme une certaine puissance dont le total ne doit pas être supérieur à la puissance de l'installation électrique. Les indications du compteur permettent de calculer la puissance de l'installation: multiplier la tension (V) par l'intensité (A) indiquée. Par exemple:

- tension: 220 V
- intensité: 30 A
- puissance de l'installation: $220 \times 30 = 6600$ watts

4. Utilisation d'un transformateur

Si l'appareil fourni doit être utilisé sous une tension différente de celle du circuit du laboratoire, il exige l'emploi d'un transformateur. Par exemple:

- le centrifugeur reçu ne peut fonctionner que sous une tension de 110 V
- la tension de l'installation électrique du laboratoire est de 220 V
- demander un transformateur 110 V – 220 V, en précisant la puissance en watts du centrifugeur.



- brancher la prise de courant du centrifugeur sur la prise 110 V du transformateur
- raccorder la prise 220 V du transformateur à la prise de courant du laboratoire (prise murale).

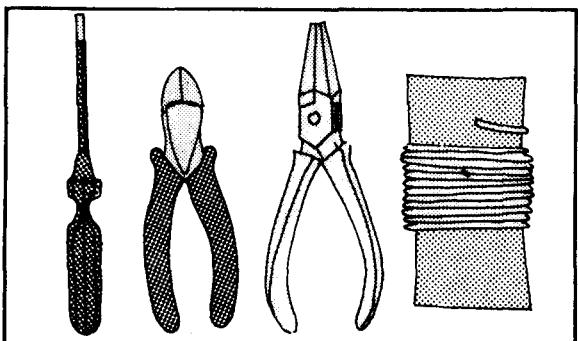
5. Arrêt d'un appareil électrique

Après avoir mis l'appareil en position d'arrêt, il faut le débrancher de la prise murale. S'il reste branché il risque, dans certains cas, de provoquer un incendie.

B. QUE FAIRE EN CAS DE PANNE?

Si un appareil ne fonctionne plus, on vérifiera:

1. les fusibles
2. la prise de courant du cordon
3. le cordon d'alimentation de l'appareil
4. la prise de courant murale
5. la tension de l'appareil et celle du compteur.



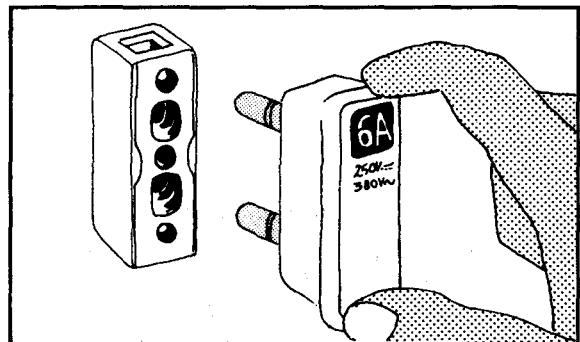
Outils utiles

- un tournevis
- une pince coupante
- une pince plate
- du fil fusible
- différents articles: tels que prises de courant, interrupteurs, etc.

AVANT TOUTE INTERVENTION

Couper le courant:

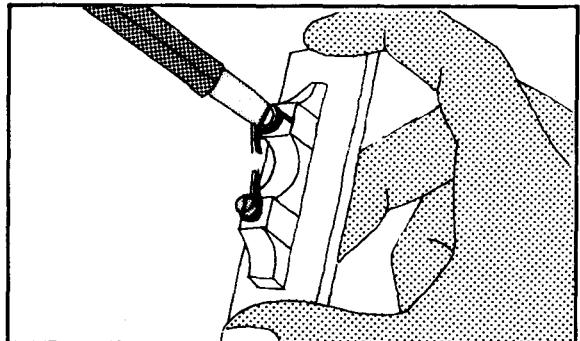
- soit en appuyant sur le bouton marqué "OFF" au compteur ou sur l'interrupteur
- soit en retirant le fusible coupe-circuit de la ligne.



1. Changement d'un fusible

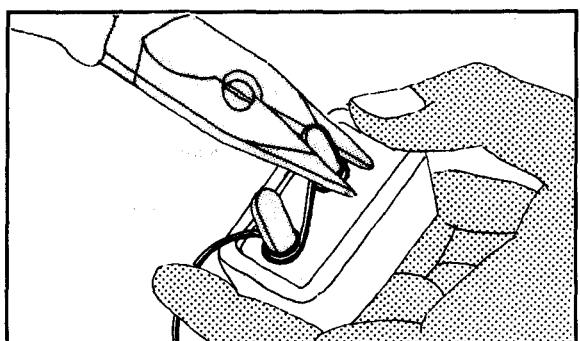
Retirer le couvercle de la boîte à fusible.

S'il s'agit d'un modèle porte-fusible, "à tabatière", le fil fusible est fixé par deux vis. S'il est coupé ou fondu, le courant ne passe plus: on dit que le plomb a sauté. Dévisser les deux vis. Retirer les restes de fil fondu.



Remettre un nouveau fusible de même calibre (épaisseur) ou à la rigueur d'un calibre inférieur. Lui donner la forme d'un "S" en faisant une boucle autour de chaque extrémité. S'il s'agit du modèle "à tabatière" (schéma ci-dessus), le fil doit bien passer sous les rondelles (collerettes) au-dessous des vis.

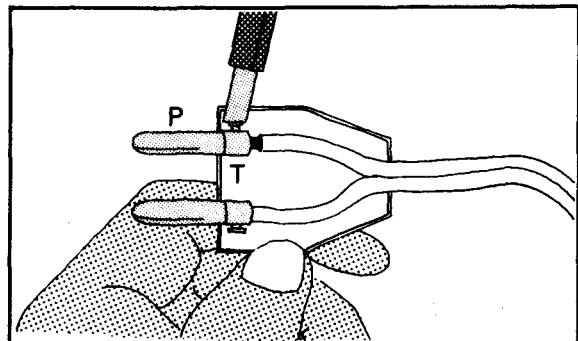
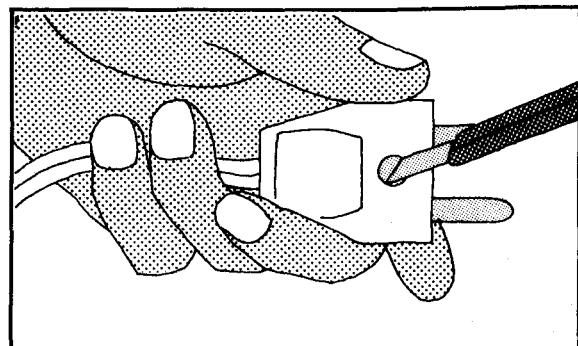
S'il s'agit d'un modèle "à broches" (schéma ci-contre), le fil est fixé à la base des broches qui sont ensuite serrées avec une pince plate.



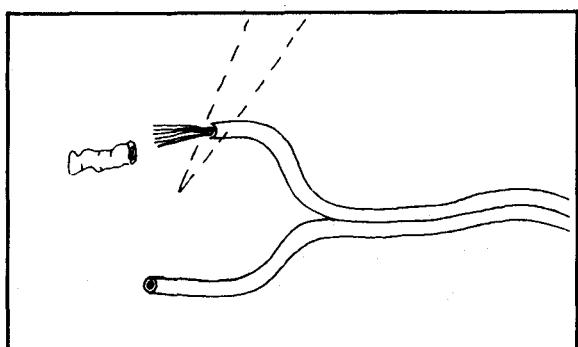
Une fois le fusible remplacé, vérifier l'ensemble de l'installation avant de rétablir le courant électrique.

2. Fiche de prise de courant

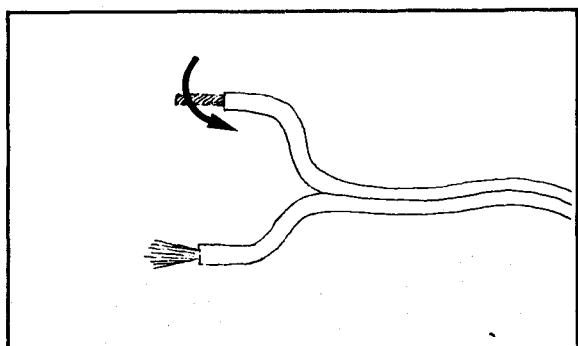
Si on soupçonne un mauvais fonctionnement de la fiche située au bout du cordon, il faut l'ouvrir. Il existe de très nombreux modèles de fiches de prise de courant. Certaines fiches ont une vis extérieure qu'il faut dévisser.



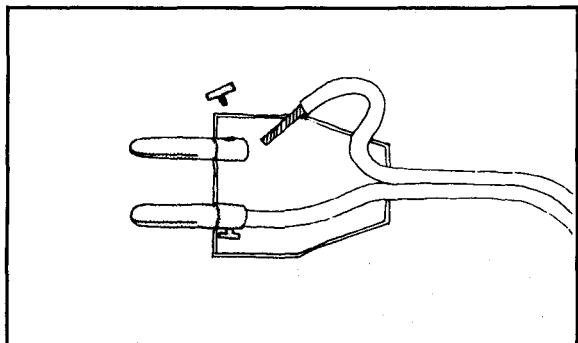
A l'intérieur de la fiche, les deux fils du cordon sont fixés dans les bornes (T) des plots (P). S'assurer que les vis des bornes sont bien serrées. Les visser à fond. Quelquefois cela suffit pour réparer la fiche.



Pour adapter une nouvelle fiche, dénuder les fils métalliques des deux fils du cordon sur 1 à 1,5 cm en grattant les gaines avec un couteau. Prendre soin de ne pas endommager le fil métallique.



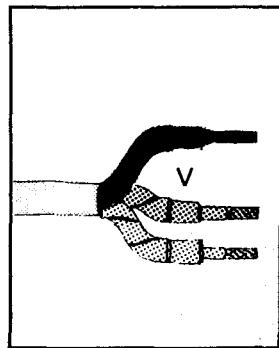
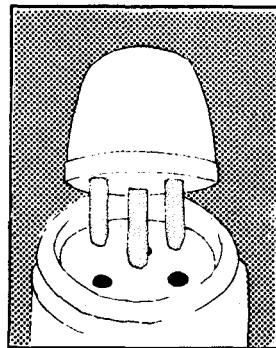
Torsader les brins de chacun des deux fils métalliques pour en faire une tresse lisse qui s'adapte exactement au plot, une fois la vis desserrée.



Introduire chaque fil dénudé dans la borne d'un plot. Visser à fond les vis des bornes. Elles doivent maintenir le fil bien serré. Vérifier par une légère traction que c'est bien le cas.

Fiche de prise de courant à 3 broches

Deux des broches — dont l'une est *neutre* — assurent le contact avec le courant. La troisième, généralement celle du milieu, sert à la mise à la terre. Il est très important de relier chaque fil à la broche voulue, et la fiche contient généralement à ce sujet des instructions à suivre à la lettre. En cas de doute, consulter un électricien.



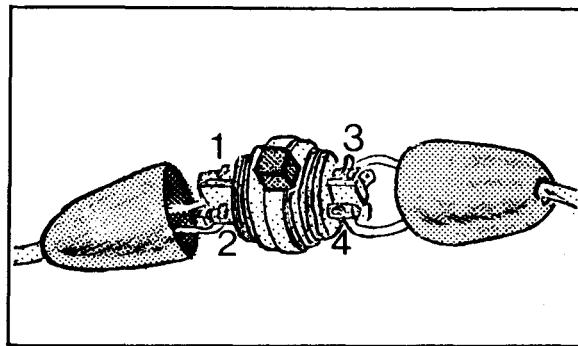
La broche de mise à la terre est entourée d'une gaine de couleur verte ou verte et jaune (V). Elle constitue un chemin de fuite préparé à l'électricité en cas d'isolation défectueux, pour éviter que le courant ne passe par le corps humain.

3. Cordon d'alimentation

Si le cordon est brûlé ou coupé, demander à un électricien de faire le raccord selon les règles de sécurité en vigueur.

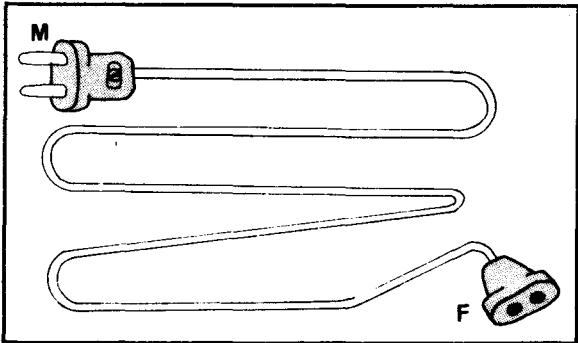
(a) Interrupteur du cordon (olives)

Il y a de très nombreux modèles différents d'interrupteurs. Pour en contrôler le fonctionnement, il les faut dévisser et ouvrir l'olive. Vérifier que les deux fils métalliques qui entrent et les deux fils métalliques qui sortent du dispositif sont bien fixés et serrés dans leurs quatre bornes respectives par les vis: 1, 2, 3, 4 de ces bornes.



(b) Rallonge

C'est un fil terminé par une fiche mâle (M) à une extrémité et par une fiche femelle (F) à l'autre. La fiche femelle est raccordée au cordon par ses deux bornes internes, de la même manière que la fiche mâle normale.

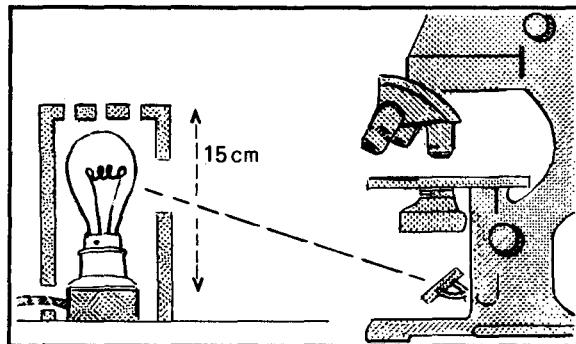


4. Prises de courant murales

Pour contrôler une prise de courant murale, y brancher une lampe en état de fonctionnement. Certaines prises sont équipées d'un petit fusible qu'on peut remplacer. Si ce n'est pas le cas, il est généralement sage de faire appel à un électricien pour réparer une prise murale.

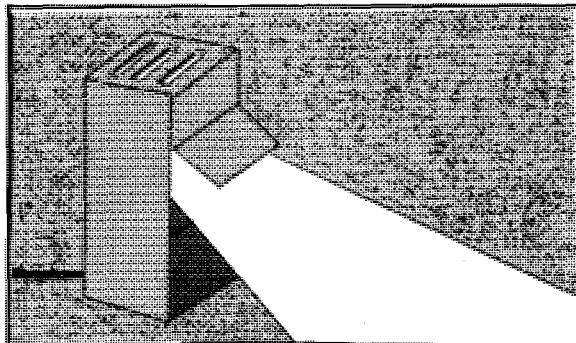
C. MONTAGE D'UNE LAMPE POUR L'ÉCLAIRAGE D'UN MICROSCOPE

Si l'on dispose d'un microscope équipé d'un miroir, on peut fabriquer une lampe d'éclairage en fixant une douille de porcelaine pour ampoule sur un socle de bois et en construisant un boîtier en bois muni d'une ouverture. Découper des fentes sur le sommet du boîtier pour permettre le refroidissement de l'ampoule.



On peut aussi aménager un volet de type abat-jour au-dessus de l'ouverture. Utiliser une ampoule électrique en verre dépoli de type "lumière de jour" (bleu blanchâtre) de:

- 60 watts pour un microscope monoculaire
- 100 watts pour un binoculaire.



ATTENTION

1. Ne jamais manipuler un montage électrique sans avoir au préalable coupé le courant.
2. Ne jamais toucher à un appareil électrique avec des mains humides (l'eau est un bon conducteur de l'électricité).
3. Ne jamais brancher un nouvel appareil sur le circuit électrique sans avoir vérifié sur sa plaque si sa tension d'utilisation est la même que la tension du courant fourni au laboratoire (110 V, 220 V, etc.).
4. Ne jamais enlever une fiche de prise de courant en la tirant par le cordon.
5. Ne jamais remplacer un fusible fondu par un fusible de calibre supérieur.

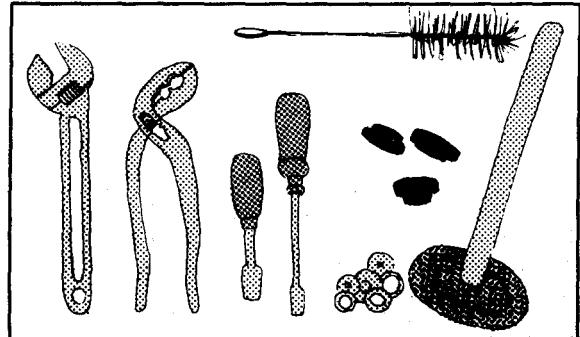
17. Plomberie : opérations simples

Une défectuosité de l'installation de plomberie (fuite d'un robinet, évier bouché, etc.) peut gêner considérablement le travail du laboratoire. Que peut-on faire si aucun plombier n'est rapidement disponible?

A. MATÉRIEL

- Clef à molette
- Pince universelle
- Jeu de tournevis
- Brosse-écouvillon
- Joints en caoutchouc pour robinet
- Bouchons en caoutchouc de flacons type "pénicilline"
- Ventouse à déboucher
- Filasse et pâte à joint, si possible.

Attention: Avant de commencer tout travail de plomberie, couper l'eau, c'est-à-dire fermer le robinet principal d'arrivée d'eau.



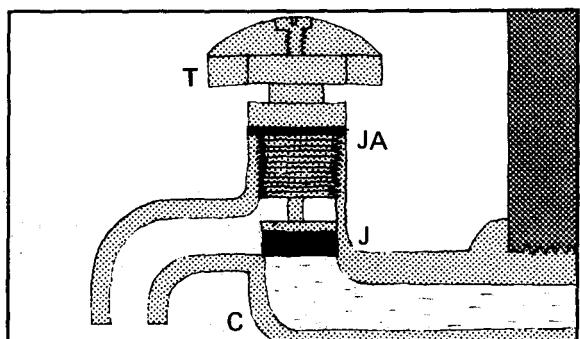
B. ROBINETS

Composition d'un robinet

Un robinet comprend deux parties:

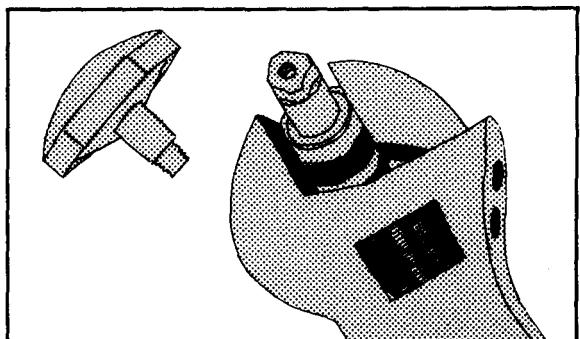
- le corps, par lequel passe l'eau (C)
- la tête de commande (T), qui, au moyen d'un joint de caoutchouc (J), contrôle l'arrivée d'eau.

Entre la tête et le corps, se trouve un joint d'assemblage (JA), en caoutchouc ou en filasse.

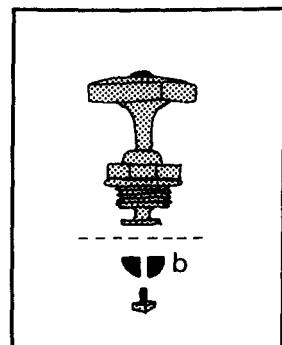
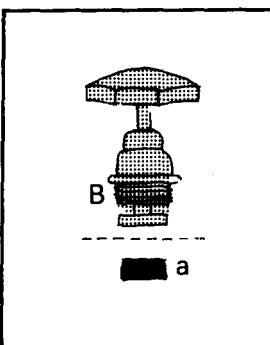


1. Si un robinet fermé continue à couler

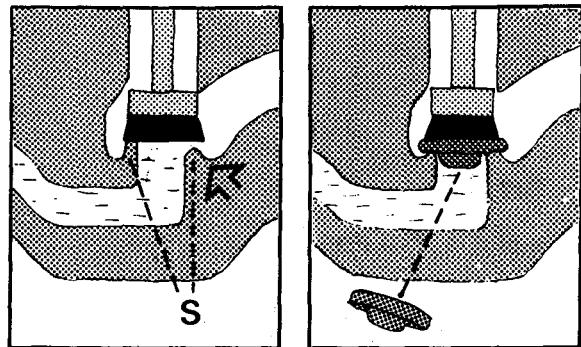
- il faut remplacer le joint de caoutchouc.
 - (a) Dévisser la tête du robinet à l'aide d'une clef à molette (sens opposé à celui des aiguilles d'une montre).



- (b) Enlever le joint usagé de la base B de la tête. Si le joint y est emboîté dans une cuvette, le décrocher. S'il est vissé, le dévisser.
 - (c) Remplacer par un joint neuf de même modèle.



(d) Si, une fois le joint remplacé, le robinet continue à fuir, c'est probablement le siège S qui reçoit le joint qui est détérioré. Placer alors un bouchon en caoutchouc dans le trou du siège. Il servira de joint provisoire, en attendant qu'un plombier puisse intervenir.

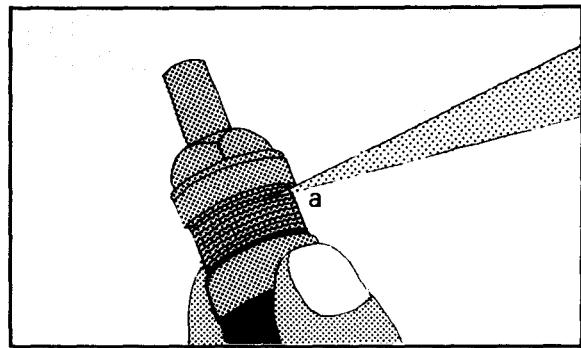


2. De l'eau coule par la tête du robinet

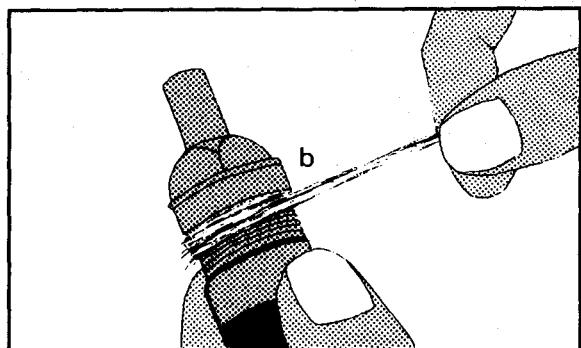
- il faut remplacer le joint d'assemblage.
 - (a) Dévisser la tête du robinet avec une clef à molette.
 - (b) Remplacer le joint d'assemblage par un autre joint en caoutchouc identique.

Si le joint est en filasse:

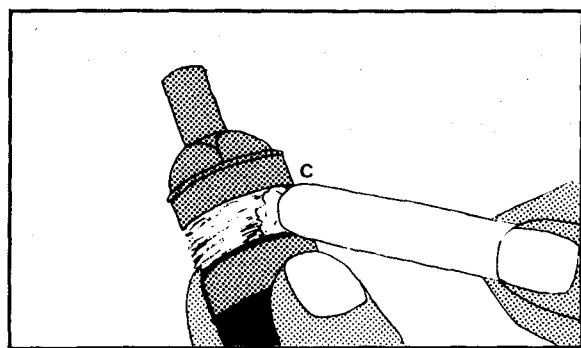
- (a) Enlever l'ancien joint, en grattant le fond des filets du pas de vis avec la pointe d'un couteau.



- (b) Entourer le filetage de filasse neuve en commençant par le haut, et en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre.



- (c) Enduire la filasse de pâte à joint.
- (d) Remonter la tête du robinet sur le corps et serrer à fond.



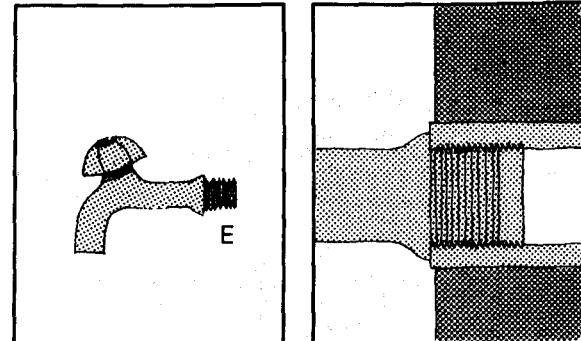
3. Remplacement complet d'un robinet

Dévisser tout le robinet défectueux à l'aide de la pince universelle (tourner dans le sens contraire à celui des aiguilles d'une montre).

Prendre le robinet neuf. Le corps se termine par un embout fileté (E). L'entourer de filasse et enduire le joint de pâte comme indiqué ci-dessus.

Visser le nouveau robinet au mur à la place de l'ancien, à l'arrivée de la canalisation.

Serrer à fond.



C. SIPHONS

Composition d'un siphon

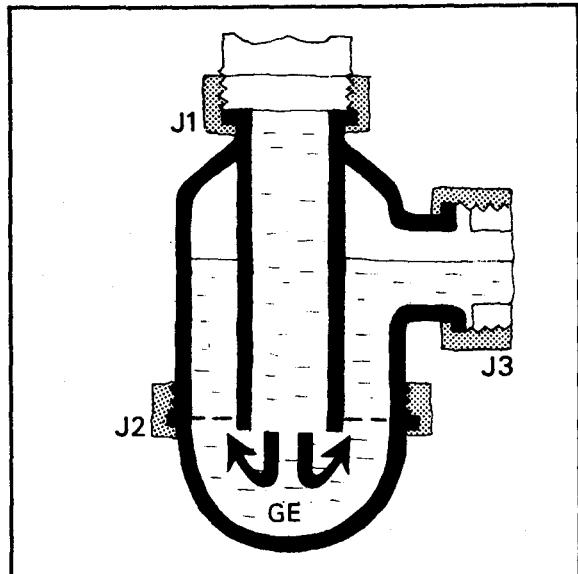
Le siphon se compose:

- du corps fixé à la sortie de l'évier par un joint J1
- du culot fixé au corps par le joint J2.

L'ensemble est fixé à la canalisation d'évacuation par le joint J3.

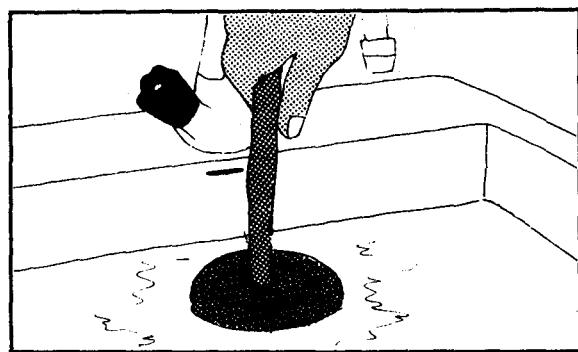
L'eau à évacuer passe dans le réservoir du culot où reste en permanence une réserve d'eau (la garde d'eau GE). Ainsi, l'air vicié des canalisations et puisards ne peut pas remonter dans l'évier.

Le siphon peut être bouché et l'eau des évier ou des lavabos ne s'écoule plus.



Débouchage à la ventouse

Placer la ventouse sur l'orifice d'évacuation de l'évier. Faire couler un peu d'eau pour favoriser l'adhésion et appuyer sur le manche en bois pour écraser la ventouse. Relever et écraser énergiquement à plusieurs reprises, le plus vite possible. L'aspiration ainsi provoquée pourra décoller les dépôts qui obstruent le siphon.



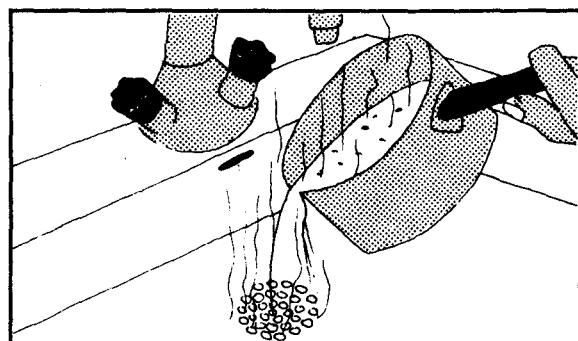
Débouchage chimique

Utiliser un produit du commerce prévu à cet effet. A défaut, utiliser 250 g de soude en pastilles. Les placer au fond de la cuvette, au-dessus de l'orifice.

Verser dessus 2 litres d'eau bouillante (attention aux éclaboussures).

Laisser agir 5 minutes.

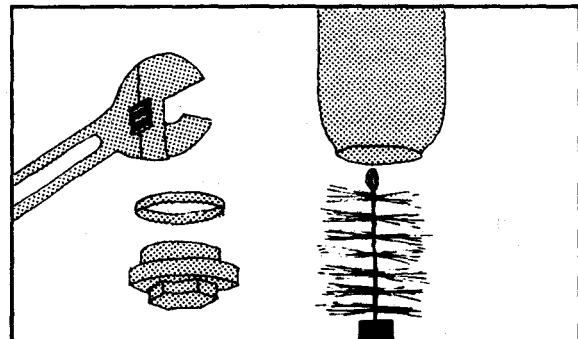
Rincer abondamment à l'eau froide du robinet.



Débouchage du siphon par vidange

Placer un seau sous le siphon. Dévisser le joint J2 du culot avec la clé à molette. Nettoyer le siphon à la brosse-écouvillon ou avec un fil de fer. Eliminer tous les déchets.

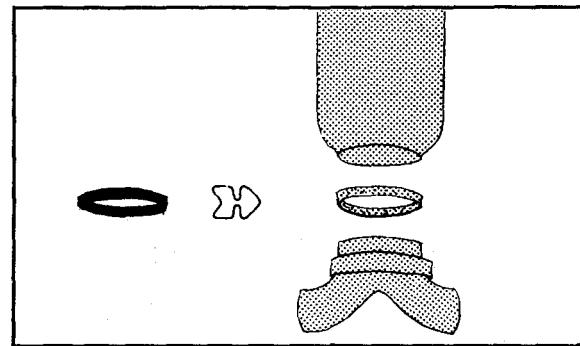
S'il y a un dépôt blanchâtre (calcaire) dans le siphon, le démonter complètement. Faire chauffer ses différents éléments dans de l'eau additionnée d'acide acétique (20 ml pour 1 litre d'eau).



Le siphon fuit

Si de mauvaises odeurs s'échappent par l'orifice d'évacuation de l'évier, la "garde d'eau" s'est écoulée par le joint J2 défectueux. Resserrer ce joint à fond, ou le remplacer par un joint neuf.

Attention: Ne jamais déverser d'acide pur dans un évier.



18. Premiers secours en cas d'accident au laboratoire

LES ACCIDENTS AU LABORATOIRE

Au laboratoire médical, les accidents peuvent être dus aux causes suivantes:

1. *Acides*
ou
2. *Alcalis*
 - éclaboussures sur la peau
 - éclaboussures dans l'œil
 - ingestion.
3. *Produits toxiques*
4. *Chaleur*
 - flammes directes
 - liquides chauffés
 - liquides inflammables
 - explosions.
5. *Verrerie brisée*

En outre, des blessures peuvent être dues à du matériel infectant, des chocs électriques, etc.

Articles utiles pour les premiers secours

- Solution aqueuse de carbonate de sodium à 5%
- Solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 2% (dans un flacon compte-gouttes pour les yeux)
- Acide acétique à 5%
- Solution saturée d'acide borique (dans un flacon compte-gouttes pour les yeux)
- Solution de poudre de savon: 5 g par litre d'eau
- Coton et gaze hydrophiles
- Merbromine (Mercurochrome) et teinture d'iode.

Ces articles doivent être facilement accessibles. Ils ne doivent pas être conservés dans une armoire fermée à clef.

Brûlures par des acides

(Acides nitrique, sulfurique, chlorhydrique et trichloracétique)

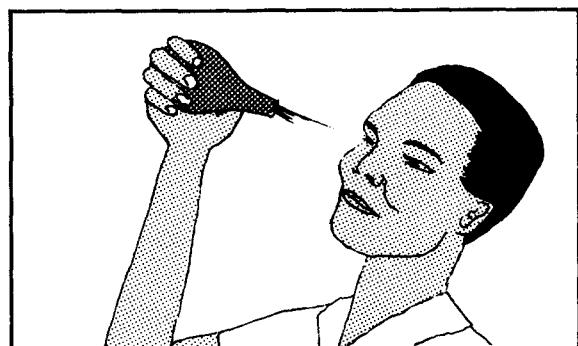
Dans tous les cas: Laver à grande eau, immédiatement.

1. Eclaboussures d'acides sur la peau

- (a) Laver à grande eau à plusieurs reprises.
 - (b) Badigeonner la peau atteinte avec un coton imprégné de solution aqueuse de carbonate de sodium à 5%.
-

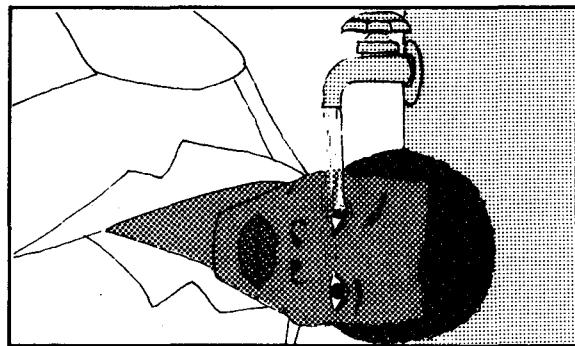
2. Eclaboussures d'acides dans l'œil

- (a) Projeter immédiatement un jet abondant d'eau avec une pissette (ou une poire en caoutchouc); le jet d'eau sera dirigé vers le coin intérieur de l'œil, près du nez.



On peut aussi baigner l'œil sous le jet d'eau du robinet.

- (b) Aussitôt après le lavage, verser dans l'œil 4 gouttes de solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 2%.
- (c) Adresser le malade au médecin. Continuer à irriguer l'œil avec la solution de bicarbonate.



3. Ingestion d'acides

Ingestion accidentelle lors d'un pipetage:

- (a) Appeler le médecin.
- (b) Faire boire aussitôt de la solution aqueuse de savon à 5% (à défaut, on peut utiliser de l'eau albumineuse: 2 blancs d'œufs mélangés à 500 ml d'eau ou de lait). Si aucun de ces liquides n'est disponible, faire boire de l'eau ordinaire.
- (c) Faire gargiller avec la solution de savon.
- (d) Faire boire 3 à 4 verres d'eau ordinaire.
- (e) Si les lèvres et la langue sont brûlées par l'acide:
 - les laver à grande eau
 - les badigeonner avec la solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 2%.

Brûlures dues à des alcalis

(Soude, potasse et ammoniaque)

Dans tous les cas: Laver immédiatement à grande eau.

Attention: Les alcalis provoquent des brûlures aussi graves, et souvent même plus graves, que les acides.

1. Eclaboussures d'alcali sur la peau

- (a) Laver immédiatement et longuement à grande eau.
- (b) Badigeonner l'endroit atteint avec un coton imprégné d'acide acétique à 5% (ou à défaut, de vinaigre pur).

2. Eclaboussures d'alcali dans l'œil

- (a) Projeter immédiatement un jet d'eau avec une pissette (ou une poire en caoutchouc); diriger le jet vers le coin intérieur de l'œil, près du nez.
- (b) Aussitôt après, laver l'œil avec une solution saturée d'acide borique. Répéter l'opération plusieurs fois.
- (c) Adresser sans attendre l'accidenté à un médecin.

3. Ingestion d'alcali

Ingestion accidentelle, lors d'un pipetage:

- (a) Appeler le médecin.
- (b) Faire boire aussitôt:
 - de la solution d'acide acétique à 5% (ou du jus de citron ou du vinaigre dilué: 1/4 de vinaigre pour 3/4 d'eau).
 - (c) Faire gargiller avec la même solution acide.
 - (d) Faire boire 3 à 4 verres d'eau ordinaire.
 - (e) Si les lèvres et la langue sont brûlées par l'alcali:
 - les laver à grande eau
 - les badigeonner avec l'acide acétique à 5%.

Intoxications

Elles peuvent être provoquées:

- par l'inhalation de vapeurs ou de gaz toxiques (comme le chloroforme)
- par l'ingestion accidentelle, lors d'un pipetage, d'une solution contenant un poison.

Dans tous les cas:

- (a) Alerter un médecin ou un infirmier qualifié, en lui communiquant, dès l'appel le nom du produit toxique en cause.
 - (b) Placer l'intoxiqué au grand air en attendant le médecin.
-

Brûlures dues à la chaleur

On peut distinguer ici deux catégories d'accidents:

1. *Les brûlures étendues ("grands brûlés")*: l'intéressé a été brûlé sur une bonne partie du corps (par exemple par de l'éther enflammé ou de l'eau bouillante renversée).
2. *Les brûlures locales*: seule une zone limitée de la peau est atteinte (verre chauffé ou flamme d'un bœuf Bunsen).

1. Grands brûlés

- (a) Le sujet est "en flammes", c'est-à-dire atteint par des projections d'éther ou d'un autre solvant enflammé; le rouler dans une couverture ou dans une blouse pour étouffer les flammes.
- (b) Alerter aussitôt le médecin de garde au service des urgences en demandant l'évacuation d'un grand brûlé.
- (c) Allonger le brûlé sur le sol. Ne pas le déshabiller mais le couvrir s'il a froid.
- (d) N'appliquer aucun traitement sur les brûlures: s'en remettre au médecin.

2. Brûlures locales

- (a) Plonger la partie atteinte dans l'eau froide ou glacée pour calmer la douleur.
 - (b) Badigeonner la brûlure de merbromine (ou de teinture d'iode).
 - (c) Faire un pansement de gaze assez lâche.
 - (d) Si la brûlure s'infecte ou se cicatrice mal, envoyer le malade chez le médecin.
Ne jamais déchirer les cloques des brûlures.
-

Blessures provoquées par du verre brisé

1. Verrerie propre

- (a) Désinfecter la peau comme pour une blessure ordinaire (avec du merbromine, de la teinture d'iode, etc.).
- (b) Recouvrir d'un pansement adhésif tout prêt du commerce.
- (c) Si la plaie saigne abondamment, arrêter le saignement en comprimant fortement avec une compresse. Diriger le blessé sur le service des urgences.
- (d) Si le saignement est très fort et en jet, l'arrêter si possible en comprimant et faire appel à un médecin ou un infirmier qualifié.
- (e) Continuer à comprimer en attendant. (C'est le médecin ou l'infirmier qui décidera, éventuellement, de poser un garrot).

2. Verrerie contenant du matériel infectant

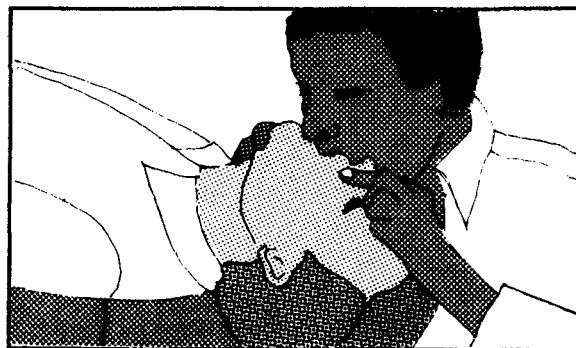
Verrerie contenant des selles, du pus, des cultures bactériologiques, etc.:

- (a) S'assurer que la plaie saigne; si ce n'est pas le cas, la presser fortement pour la faire saigner quelques minutes.
- (b) Badigeonner toute la plaie (bords et intérieur) à la teinture d'iode ou avec un antiseptique utilisé en chirurgie.
- (c) Laver généreusement à l'eau savonneuse.
- (d) Badigeonner de nouveau à la teinture d'iode.
- (e) S'il s'agit d'une matière connue comme très infectante (cultures bactériennes, pus, etc.) adresser le malade au médecin.

Chocs électriques

Le laboratoire utilise généralement du courant alternatif à basse tension (120 ou 220 volts) et les chocs électriques y sont rares. Ils peuvent être dus à la manipulation d'un appareil défectueux, notamment avec des mains humides. L'intéressé peut être atteint de syncope ou d'asphyxie.

- (a) Avant tout, couper le courant électrique au compteur.
- (b) Appeler un médecin.
- (c) Commencer immédiatement la respiration artificielle (bouche à bouche), accompagnée, le cas échéant, d'un massage externe du cœur.



PRÉCAUTIONS À PRENDRE POUR ÉVITER LES ACCIDENTS

Manipulation des acides et des alcalis

1. Dilution d'acide sulfurique dans l'eau

Toujours ajouter l'acide sulfurique à l'eau, goutte à goutte, en remuant après chaque addition. Opérer de préférence dans un évier. *Ne jamais verser de l'eau sur de l'acide sulfurique* (danger d'éclaboussures).

2. Flacons contenant des acides et des alcalis

Les ranger sur les rayons inférieurs des placards. Lorsqu'on les manie, les tenir d'une main ferme et sèche, en position verticale. Ne pas conserver d'acides ou d'alcalis dans des flacons à bouchons à l'émeri (ils pourraient coller).

3. Pipetage

Pour mesurer les volumes d'acides ou d'alcalis, utiliser de préférence de petites éprouvettes. Quand un pipetage plus précis est nécessaire, pipeter avec une pipette bouchée au cordon cardé, ou munie d'un tube d'aspiration en caoutchouc. Pipeter lentement, en surveillant le niveau.

Chauffage de la verrerie et des liquides

1. Tubes à essai

Ne jamais chauffer le fond d'un tube à essai: le liquide pourrait gicler. Chauffer la partie moyenne du tube, en agitant doucement. L'ouverture du tube doit être dirigée vers une surface de travail vide, ou vers un évier, jamais vers soi, ni vers une autre personne.

2. Verre ordinaire et Pyrex

Seuls les récipients en Pyrex ou en porcelaine peuvent être chauffés à la flamme d'un béc蓉sen. Le verre ordinaire se briserait.

3. Liquides inflammables

Les liquides inflammables, tels qu'éther, acétone, alcool, benzène, toluène et sulfure de carbone ne doivent être conservés au laboratoire qu'en petites quantités.

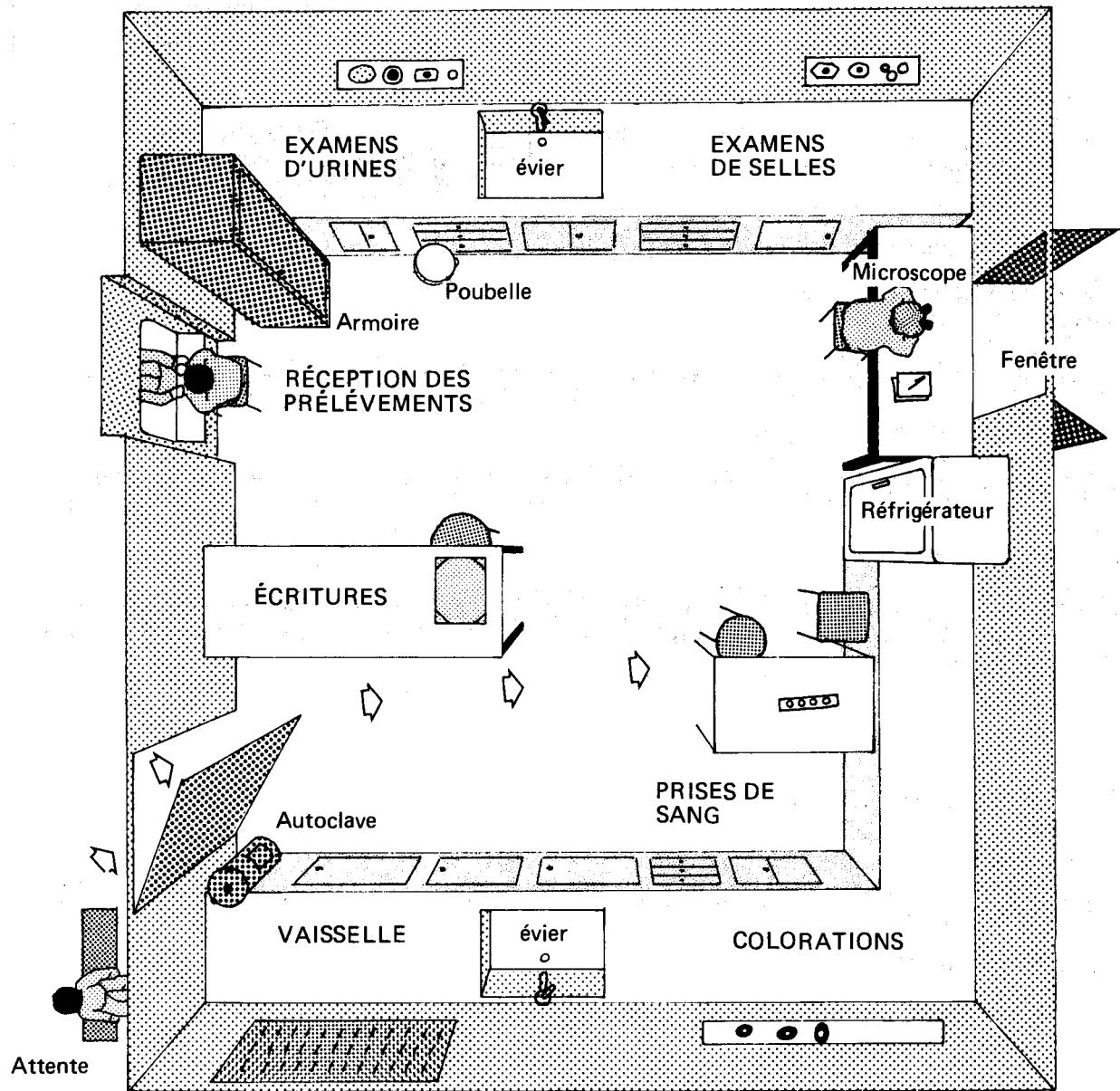
ATTENTION: L'éther prend feu même si la flamme est à une distance de plusieurs mètres. Ne jamais mettre un flacon d'éther sur une table où brûle une flamme (béc蓉sen, lampe à alcool, etc.). Le sulfure de carbone est encore plus dangereux.

4. Gaz butane

Pour allumer un brûleur, toujours enflammer l'allumette et l'approcher du brûleur avant d'ouvrir le robinet d'arrivée du gaz. Fermer les bouteilles de gaz butane tous les soirs. Une fois par an, changer les tuyaux de raccordement en caoutchouc.

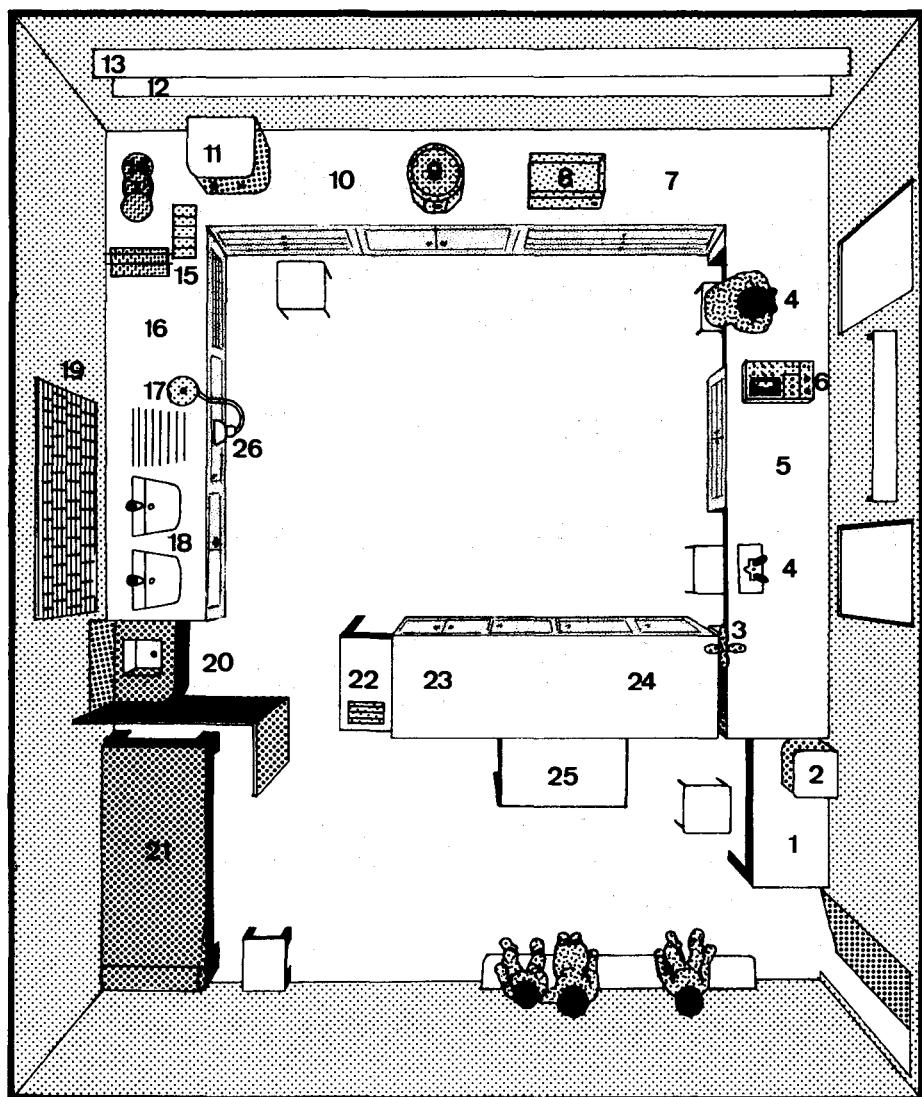
19. Plan d'un laboratoire médical périphérique

Le plan proposé montre l'aménagement d'un laboratoire médical périphérique rattaché à un centre de santé. Il s'agit d'un laboratoire qui peut pratiquer, en totalité ou en partie, les examens de laboratoire exposés dans le présent Manuel. Le plan illustre les conditions minimales souvent rencontrées: *une seule pièce* est disponible. Celle-ci devrait mesurer au moins 5 mètres sur 6.



Si l'on dispose de deux pièces, il est conseillé de placer dans la deuxième le service de transfusion sanguine. S'il n'y a pas de service de transfusion, cette deuxième pièce pourra être utilisée pour faire la vaisselle et effectuer les stérilisations. Le matériel souillé ou contaminé doit être éliminé le plus rapidement possible, tant pour la sécurité du personnel que pour éviter tout risque d'erreur et de contamination.

Autre disposition possible d'un laboratoire périphérique. Il va sans dire qu'on la modifiera en fonction des conditions locales.



- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Table d'examen | 14. Balance |
| 2. Réfrigérateur pour échantillons de sang | 15. Coloration |
| 3. Centrifuge à main | 16. Examen des crachats |
| 4. Microscope | 17. Bec Bunsen |
| 5. Hématologie | 18. Eliers |
| 6. Colorimètre | 19. Séchage de la verrerie |
| 7. Transfusions sanguines | 20. Evier pour liquides à jeter |
| 8. Bain-marie | 21. Lit pour donneurs de sang |
| 9. Centrifugeur | 22. Ecritures |
| 10. Sérologie de la syphilis et biochimie | 23. Echantillons de selles |
| 11. Réactifs: réfrigérateur | 24. Echantillons d'urines |
| 12. Réactifs: étagères | 25. Réception des échantillons |
| 13. Verrerie | 26. Bouteille de gaz |

20. Matériel nécessaire à l'équipement d'un laboratoire périphérique

On trouvera ci-après une liste des fournitures nécessaires pour que le laboratoire soit en mesure d'exécuter tous les examens décrits dans le présent Manuel. Un tel laboratoire sera généralement situé dans un petit hôpital rural (niveau du district) possédant 60 à 100 lits. Le laboratoire d'un centre de santé non rattaché à un hôpital aura probablement besoin d'un matériel moins important, car certaines opérations — transfusions sanguines, réaction du VDRL, etc. — ne lui seront pas confiées.

Les quantités mentionnées pour les différentes fournitures conviennent pour un laboratoire où travaillent 1 ou 2 techniciens qui effectuent chaque jour 20 à 50 examens divers, et qui disposeront donc, dans ces conditions, d'une autonomie d'environ 6 mois.

I. APPAREILS DE LABORATOIRE

A. Appareils indispensables

1. *Microscopes*

- Un microscope avec tube binoculaire incliné, chariot, trois objectifs (10 x, 40 x, 100 x), oculaires (5 x et 10 x), condenseur, miroir plan/concave. Si le laboratoire est raccordé au réseau électrique, une lampe électrique pour le microscope (hématologie).
- Un microscope avec tube monoculaire incliné, doté des accessoires énumérés ci-dessus, pour les autres activités du laboratoire (parasitologie, analyses d'urines, bactériologie, etc.).

Au niveau du centre de santé, un seul microscope monoculaire suffit.

2. *Centrifugeur*

- Un centrifugeur électrique pour micro-hématocrite, avec échelle pour la lecture.
- Un centrifugeur à main avec 4 porte-tubes.

3. *Balance*

Une balance de précision est nécessaire si le laboratoire doit préparer lui-même ses réactifs. Accessoire: une boîte de poids.

4. *Réfrigérateurs*

Partout où est créé un service de transfusion sanguine, celui-ci doit pouvoir disposer de son propre réfrigérateur. Les autres réactifs (VDRL, épreuves de grossesse, etc.) et le reste des articles à conserver au froid (certains milieux de transport, échantillons, etc.) peuvent être placés dans le réfrigérateur de l'hôpital ou du centre de santé.

5. *Bain-marie électrique à thermostat (37 à 56°C)*

Il est utile pour un certain nombre d'examens: épreuves de compatibilité, réaction du VDRL, inactivation des sérum et autres épreuves exigeant une température constante pendant un laps de temps relativement long.

6. *Appareil rotateur pour réaction du VDRL*

Indispensable à tout laboratoire qui pratique couramment la réaction du VDRL.

7. *Compteur différentiel*

Bien que l'on puisse utiliser un compteur à main, le compteur différentiel fait gagner du temps, tout en étant beaucoup plus efficace.

8. *Photomètre ou colorimètre*

Sert à la chimie sanguine et au dosage précis de l'hémoglobine. L'UNICEF fournit un modèle pouvant fonctionner sur batterie (ref. 09-309-98 ou 09-310-00).

B. Appareils supplémentaires

1. *Autoclave*

Quand le laboratoire est situé dans un hôpital, il peut utiliser le service de stérilisation de celui-ci. S'il fait partie d'un centre de santé, il devra posséder:

- soit un autocuiseur (marmite à pression)
- soit un petit autoclave (électrique ou chauffé sur un réchaud à pétrole ou à gaz).

2. *Four Pasteur*

Dans un laboratoire d'une certaine importance, un petit four Pasteur est utile pour sécher la verrerie et compléter l'autoclave pour les stérilisations.

3. Balances

Si le laboratoire est appelé à préparer une large gamme de réactifs, il sera bon qu'il dispose d'une balance Roberval, avec boîte de poids correspondants.

4. Alambic à eau distillée ou appareil à déminéraliser l'eau

C'est un appareil utilisant des cartouches de résine-échangeuse d'ions (voir page 59).

On peut aussi utiliser un alambic à eau distillée. Le modèle de l'UNICEF (ref. 01-680-02) est en acier inoxydable, donc solide.

Si tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi, ou si l'on dispose d'eau distillée, cet appareil n'est pas indispensable et peut être rayé de la liste.

II. MATÉRIEL DE PRÉLÈVEMENT

Seringues graduées de 20 ml	2
Seringues graduées de 10 ml	10
Seringues graduées de 5 ml	20
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 18G (1,2 mm) x 40 mm	6 x 12
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 19G (1,0-1,1 mm) x 40 mm	6 x 12
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 20G (0,9 mm) x 40 mm	2 x 12
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 22G (0,7 mm) x 40 mm	6 x 12
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 23G (0,6 mm) x 32 mm	2 x 12
Aiguilles (à embase correspondant à celle des seringues) taille 25G (0,5 mm) x 16 mm	3 x 12
Bandes ou tube de caoutchouc pour garrot (2 à 5 mm)	2
Vaccinostyles pour prélèvement de sang capillaire	10 x 12
Coton hydrophile blanc	2 x 500 g
Coton cardé	2 x 500 g
Flacons vides ayant contenu des antibiotiques, des réactifs, etc., pour injections (5, 10, 20 ml)	Autant que possible

Matériel supplémentaire recommandé

Aiguilles pour prises de sang, stériles, à jeter	selon les besoins
Aiguilles à plateau, 18G	12
Lancettes stériles, à jeter, pour prélèvement de sang capillaire	selon les besoins
Bistouri à lame interchangeable (lèpre)	1
Petite pince clamp courbe, sans griffes (lèpre)	1
Boîtes en plastique ou en carton, à jeter, pour échantillons de selles	500
Applicateurs en bois (12 cm x 1 mm) (peuvent être fabriqués sur place)	500
Flacons de 2,5 ml et 5 ml, de préférence en plastique	50
Flacons en verre blanc, à large ouverture, avec bouchon métallique à visser et joint de caoutchouc, pour échantillons de crachats	25
Flacons en verre blanc, de 25 ml, à bouchon métallique à visser et joint de caoutchouc, pour prélèvements divers	25
Flacons à large ouverture, toutes grandeurs, pour échantillons d'urines	20 à 40
Pince spéciale pour biopsie cutanée (onchocercose)	1
Abaisse-langues en bois	50

III. VERRERIE

Baguettes de verre plein, 6 mm de diamètre	3
Béchers (forme basse)	
— de 50 ml, en plastique	4
— de 100 ml, en plastique	4
— de 250 ml, en plastique	4
Cuves à coloration, rectangulaires, pour 20 lames	4
Entonnoir en verre, 60 mm de diamètre	1
Entonnoirs en verre, 90 mm de diamètre	2
Entonnoir en plastique, 200 mm de diamètre	1
Eprouvettes graduées, avec bouchon, en verre:	
— 25 ml	3
— 100 ml	3
— 250 ml	2
— 500 ml	1
— 1000 ml	1
Erlenmeyers en Pyrex, à large col, de 250 ml	3
Erlenmeyers en Pyrex, à large col, de 500 ml	2
Flacons compte-gouttes en plastique ou en verre, de 100 ml	12
Flacons compte-gouttes en verre brun, de 100 ml	3

Flacons à réactif en plastique ou en verre:	
- 100 ml	20
- 500 ml	10
- 1000 ml	10
Fioles jaugées, en verre, avec bouchons:	
- 100 ml	4
- 250 ml	2
- 500 ml	2
- 1 litre	1
Lames pour microscope de 25 x 75 mm (épaisseur 1,1 à 1,3 mm)	2 x 1000
Lamelles carrées de 20 x 20 mm (épaisseur 0,13 à 0,16 mm)	20 x 100
Pissettes en plastique de 500 ml	2
Pissettes en plastique de 1000 ml	2
Verres de montre, 50 mm de diamètre	2
Pipettes graduées, le zéro en haut et non terminales:	
- 1 ml (subdivisions 0,01 ml)	12
- 2 ml (subdivisions 0,01 ml)	10
- 5 ml (subdivisions 0,1 ml)	10
- 10 ml (subdivisions 0,1 ml)	6
Pipettes Pasteur	2 x 144
Tubes à essai en Pyrex, 150 x 16 mm	50
Tubes de Kahn en Pyrex, 85 x 15 mm	100
Tubes à essai en Pyrex, pour épreuve de compatibilité	20
Tubes à centrifuger fond conique, 15 ml	40
Tubes à centrifuger fond conique, 15 ml, gradués en 0,1 ml	6
Tubes de verre ordinaire, épaisseur 1 à 1,5 mm, diamètre 7 à 8 mm	1 kg

IV. ARTICLES POUR HÉMATOLOGIE

Pipettes de Sahli, 0,02 ml, avec tuyau en caoutchouc	30
Pipettes pour sang, 0,05 ml	20
Cellules-hématimètres:	
— Neubauer modifiée (à lignes brillantes si possible)	3
— Fuchs-Rosenthal	1
Lamelles optiquement planes pour cellules-hématimètres	12
Compteur à main	1
Tubes de Westergren pour vitesse de sédimentation	30
Supports pour tubes de Westergren	2
Tubes capillaires héparinés pour microhématocrite	1000
Cire à boucher les tubes du microhématocrite	1 série (10 plateaux)
Flacons pour transfusion sanguine	300
Nécessaire pour prélèvements sanguins	30
Plaques d'opale pour groupages sanguins	3

V. ARTICLES POUR BACTÉRIOLOGIE ET BIOCHIMIE

Fil Nichrome, 1 mm de diamètre	1 mètre
Porte-fils	4
Bloc en bois pour porte-fils	1
Tubes standards pour protéines	1 jeu
Portoirs, grands, pour 12 tubes à essai	4
Portoirs, petits, pour 12 tubes à essai	4
Pince en bois pour tubes à essai	2
Pince porte-lames en acier inoxydable	2
Bec Bunsen fonctionnant au gaz butane	1

Bouteilles de gaz butane	selon les besoins
Trépied et toile métal-amianté	1
Urinomètre	1
Spatules, différentes grandeurs, pour peser les réactifs	3

VI. REGISTRES ET ARTICLES DE PAPETERIE

Registres cartonnés, grand format	6
Registre cartonné, petit format (pour donneurs de sang)	1
Marqueurs sur verre, cire, rouges	12
Marqueurs sur verre, cire, bleus	12
Marqueur, pointe diamant	1
Crayons, mine de plomb	12
Stylos bille, bleus ou noirs	3
Stylos bille, rouges (pour inscrire les cas positifs)	2
Cellophane	3 rouleaux
Papier adhésif blanc	3 rouleaux
Etiquettes	1000
Formulaires tout prêts (de préférence normalisés à l'échelon central)	selon les besoins

VII. DIVERS

Minuterie, 0-60 minutes, avec sonnerie	1
Lampe à alcool	1
Marteau	1
Tenailles	1
Pince universelle, type électricien	1
Tournevis (petit, moyen, gros)	3
Lime à métaux, ronde, 5 mm	1
Petites limes à ampoules	12
Casserole à fond plat, avec couvercle, 30 cm	1
Chauffe-plat	1
Mortier avec pilon (10 cm)	1
Bassines en plastique 50 x 30 cm	3
Seau en plastique, 12 litres	1
Poire en caoutchouc (pour le nettoyage des pipettes)	1
Ciseaux (moyens et grands)	2 paires
Trompe à vide, métallique	1
Thermomètre, 0°-100°C	1
Bouchons en caoutchouc	1 jeu
Bouchons de liège	1 jeu
Tire-bouchon	1
Brosses-écouvillons pour le nettoyage de la verrerie (différentes grandeurs)	6
Papier-filtre, 15 cm, No. 1	4 boîtes
Papier pH, gamme étroite (6, 8-7, 2)	6
Papier pH, gamme large (0-12)	6
Papier de tournesol	6
Papier spécial pour lentilles	2 paquets
Papier hygiénique	2 rouleaux
Serviettes et chiffons propres	selon les besoins
Huile à immersion	6 bouteilles (10 ml chaque)

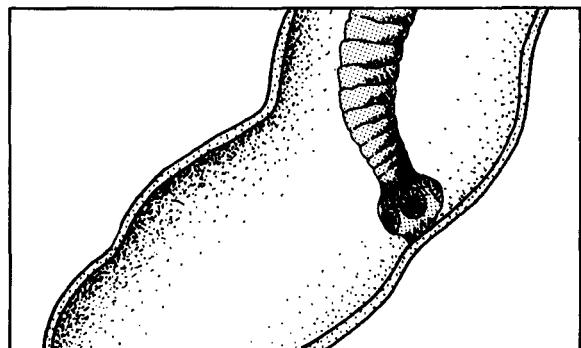


IIème PARTIE

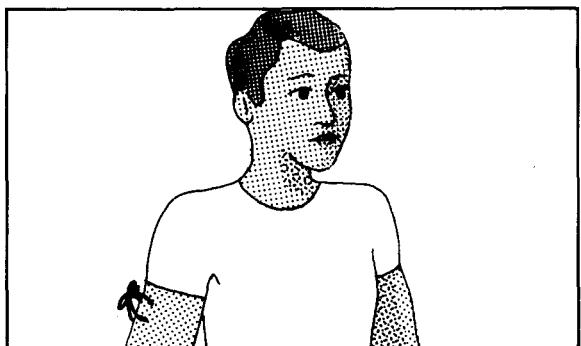


A. PARASITOLOGIE

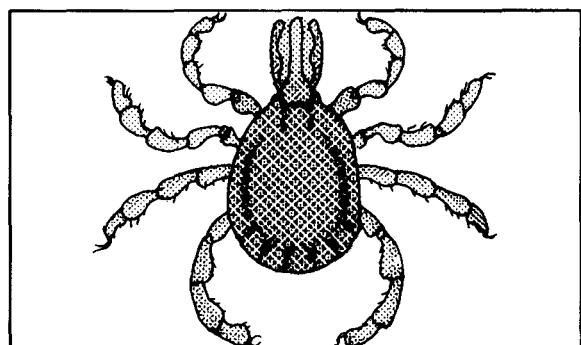
Introduction



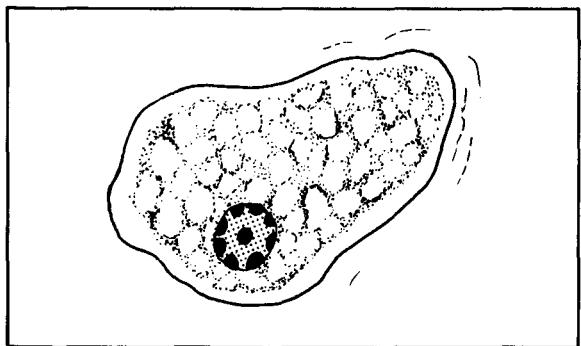
L'étude des parasites qui provoquent des maladies chez l'homme s'appelle la parasitologie médicale. Un parasite est un organisme qui vit dans ou sur un autre organisme vivant, d'une autre espèce, et qui en tire sa subsistance.



On appelle "hôte" l'organisme dont le parasite se nourrit.

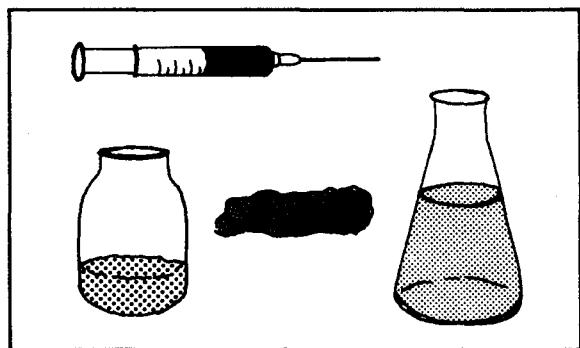


On appelle "ectoparasite" un parasite, comme la tique, qui vit *sur* l'hôte.



On appelle "endoparasite" un parasite comme l'ankylostome ou l'amibe qui vit *dans le corps* de l'hôte.

Le diagnostic de parasitologie médicale pratiqué au laboratoire peut exiger l'examen de selles, urines, crachats, sang, liquide céphalo-rachidien (LCR) et autres sécrétions ou tissus.



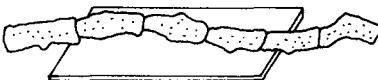
1. Selles : Que faut-il chercher? Comment recueillir les échantillons

Au laboratoire, les selles donnent lieu aux examens suivants:

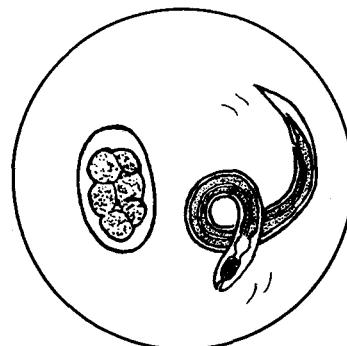
1. EXAMENS PARASITOLOGIQUES

Recherche de parasites tels que:

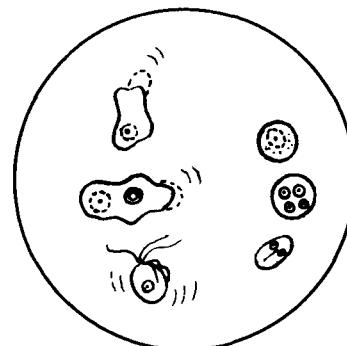
- (a) *vers* visibles à l'œil nu (voir p. 143).



- (b) *œufs* de ces vers ou leurs larves, visibles uniquement au microscope (voir p. 122).



- (c) *protozoaires* (micro-organismes unicellulaires) qui peuvent être trouvés sous leur forme mobile (végétative) voir p. 147 ou sous forme de kyste immobile et résistant (voir p. 155).



2. EXAMENS BACTÉRIOLOGIQUES

Recherche par culture des bactéries responsables de maladies (voir p. 268).

3. EXAMENS CHIMIQUES

Ils visent essentiellement à déceler la présence de sang (voir p. 175).

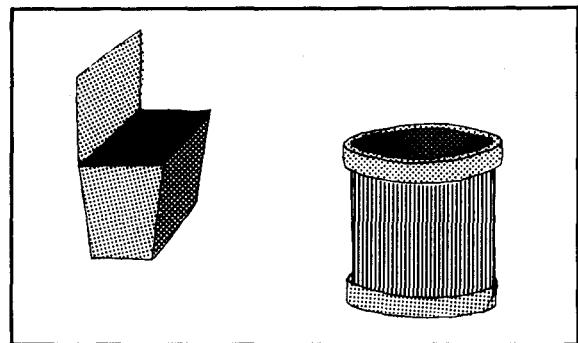
Les autres examens chimiques sont moins fréquents.

OBTENTION DES ÉCHANTILLONS

Du soin apporté à l'obtention des échantillons dépendra en grande partie la qualité du résultat. Quand on recherche des parasites, on prendra les précautions suivantes.

1. Obtention d'une quantité suffisante

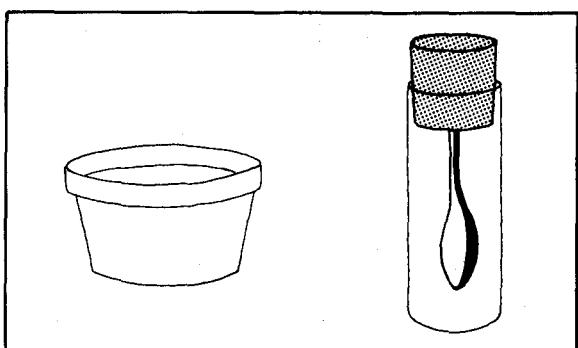
- pour trouver les parasites, s'ils sont rares,
- pour éviter le dessèchement rapide des selles,
il faut au minimum un échantillon de 4 ml (4 cm³).



2. Fourniture d'un récipient au malade

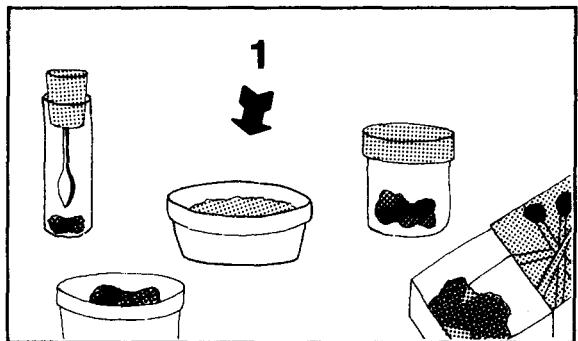
Le laboratoire doit s'efforcer dans toute la mesure possible de remettre au malade l'un des types de récipients suivants:

- (a) boîte en carton paraffiné
- (b) boîte métallique vide, avec couvercle



3. Examen de selles fraîches

- (a) Il faut examiner les selles dans l'heure qui suit l'obtention de l'échantillon.
- (b) Si l'on reçoit tout un lot de selles, *examiner en premier les selles liquides*, contenant du mucus ou du sang, qui risquent d'abriter des amibes mobiles dont la vie à l'air libre est de courte durée.



ATTENTION

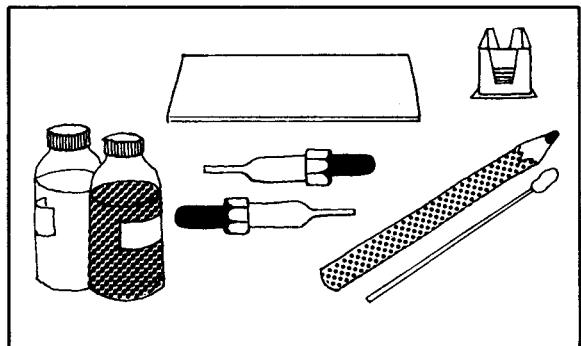
1. Ne jamais laisser des selles exposées à l'air libre dans des récipients sans couvercle.
2. Ne jamais grouper toutes les selles pour les examiner en fin de matinée (c'est-à-dire deux ou trois heures plus tard).
3. Ne jamais accepter des selles mélangées à de l'urine (dans un pot de chambre ou un bassin).
4. Ne jamais poser un récipient contenant des selles sur un formulaire d'analyse.

Pour les échantillons de selles pour examens bactériologiques avec agents conservateurs (recherche du vibrion cholérique, culture d'autres bactéries provoquant la dysenterie) voir page 268.

2. Selles : Préparation des lames

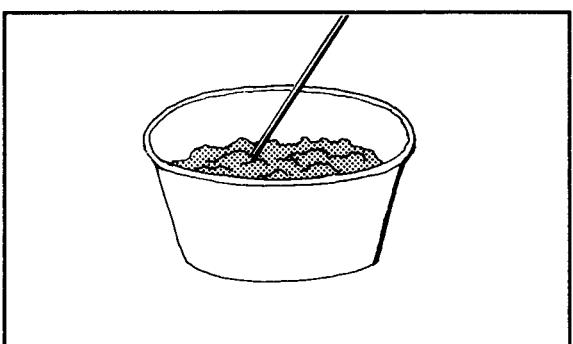
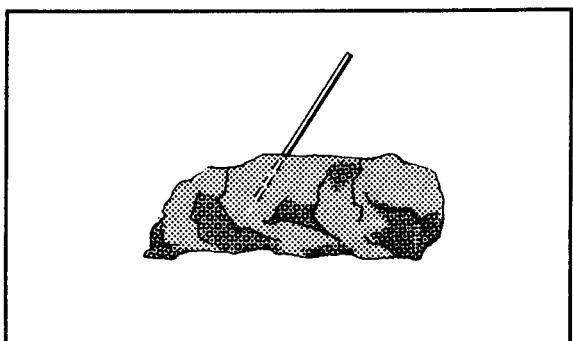
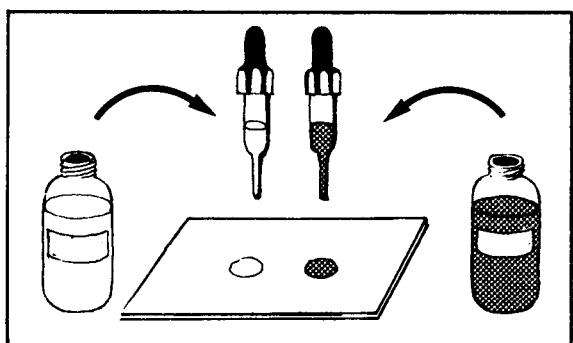
MATÉRIELS

- Lames de verre pour microscope
- Lamelles 20 x 20 mm
- Applicateurs en bois ou anses de platine (fil d'un alliage de nickel et de chrome de 0,46 mm)
- Crayon gras
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Solution de Lugol (réactif No. 38), diluée 5 fois.

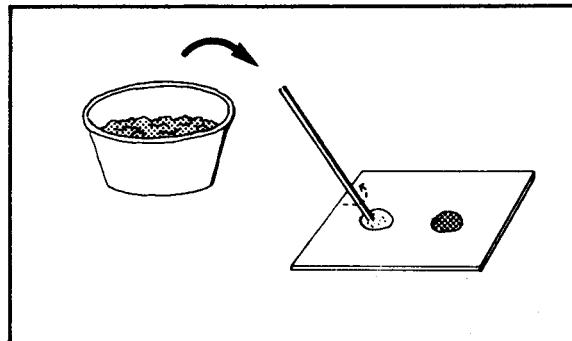


MÉTHODE

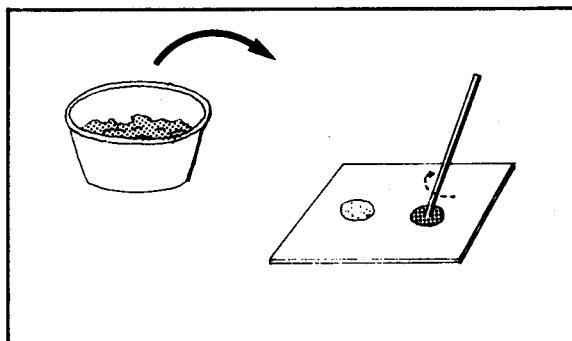
1. Sur une lame, déposer:
 - 1 goutte de soluté physiologique *au milieu de la moitié gauche*
 - 1 goutte de Lugol *au milieu de la moitié droite*.
2. Prendre avec un applicateur ou une anse de platine un petit morceau de selles (de ce volume: O environ). Si les selles:
 - sont moulées, prendre bien à l'intérieur de l'échantillon (œufs de parasite?), ainsi qu'à la surface,
 - contiennent du mucus ou sont liquides, prélever dans le mucus sanguinolent, à la surface des selles ou à la surface du liquide (amibes?).



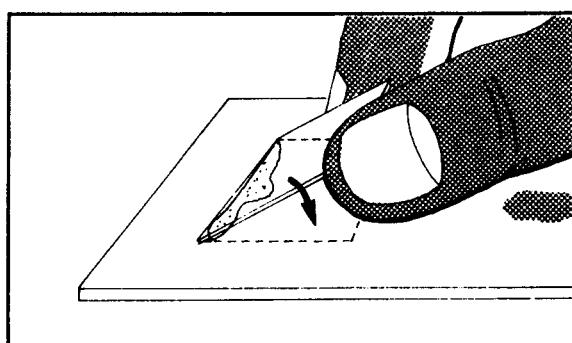
3. Mélanger l'échantillon de selles à la goutte de soluté physiologique.



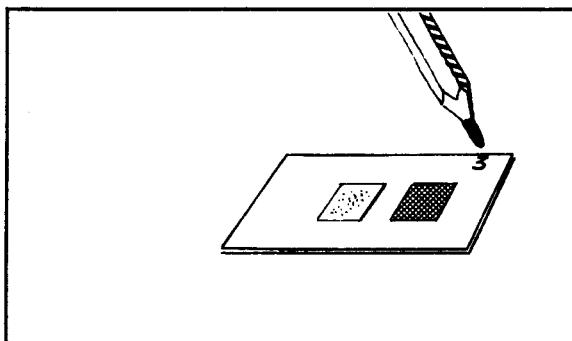
4. A l'aide de l'applicateur ou de l'anse de platine, prendre un 2ème échantillon de selles et le mélanger à la goutte de Lugol.



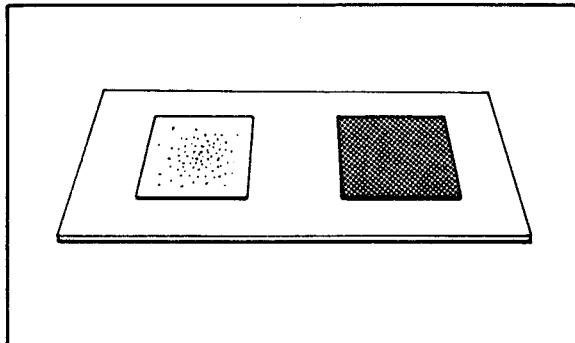
5. Recouvrir chaque préparation d'une lamelle (mettre la lamelle comme indiqué sur le dessin, pour éviter la formation de bulles d'air).



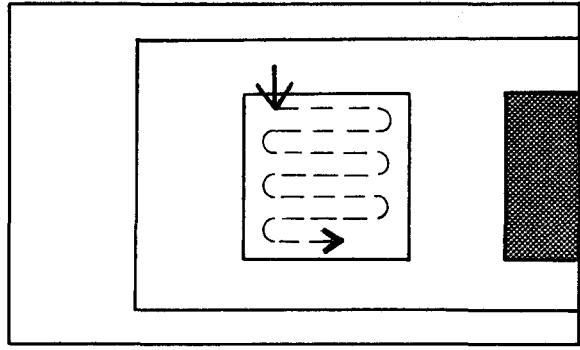
6. Incrire au crayon gras le numéro de l'échantillon sur la lame.



7. Examiner les préparations au microscope. Pour la préparation au soluté physiologique, utiliser les objectifs 10 x et 40 x et les oculaires 5 ou 6 x; pour la préparation au Lugol, employer l'objectif 40 x. Comme les œufs et les kystes sont incolores, réduire l'éclairage en fermant le condenseur, ou l'abaisser pour augmenter le contraste.



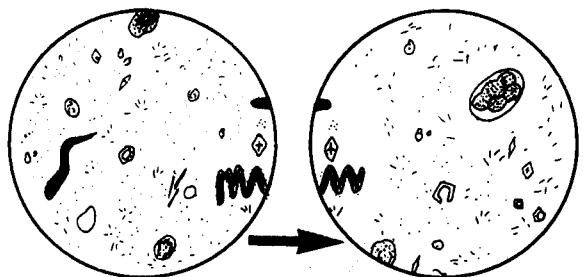
8. Examiner la 1ère préparation à l'objectif 10 x, en partant du coin en haut et à gauche, comme indiqué ci-contre.



Bien examiner tout le champ, en prenant un repère sur le bord du champ et en faisant avancer la lame jusqu'à retrouver le repère sur l'autre bord du champ, et ainsi de suite pour toute la lame.

Sur chaque ligne horizontale d'examen, passer au moins une fois à l'objectif 40 x, pour voir s'il n'y a pas de protozoaires, qui sont de très petite taille.

Examiner ensuite à l'objectif 40 x la préparation au Lugol.



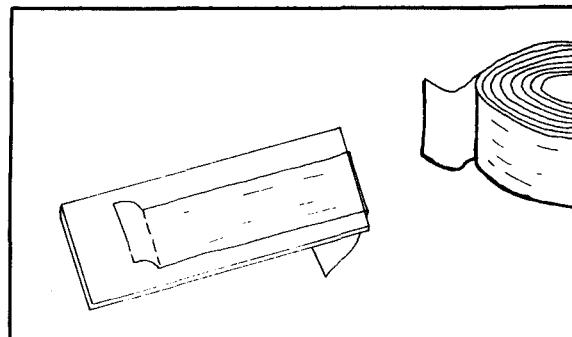
3. Technique spéciale pour la recherche des œufs d'oxyure

Principe

Les œufs d'oxyure (*Enterobius vermicularis*) sont généralement recherchés (surtout chez les enfants) dans les replis de la peau, autour de l'anus. Ils n'apparaissent que rarement dans les selles.

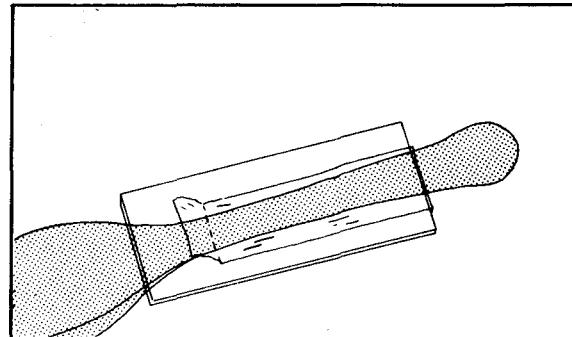
MATÉRIEL

- Ruban adhésif transparent
- Cuillère de 10 cm de long, ou, mieux, abaisse-langue en bois
- Microscope

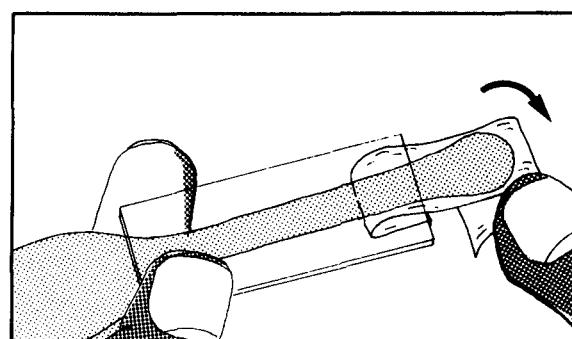


MÉTHODE

1. Coller un morceau de ruban adhésif sur une lame comme indiqué sur le dessin.

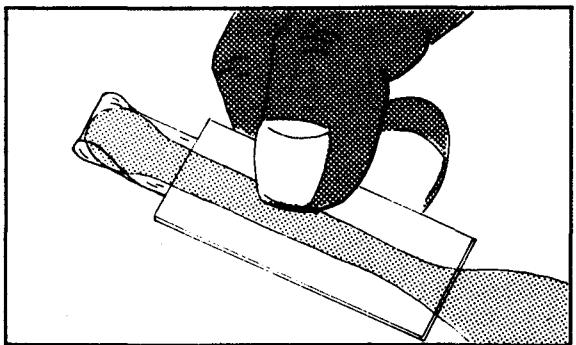


2. Placer la lame à plat sur le manche de la cuillère.

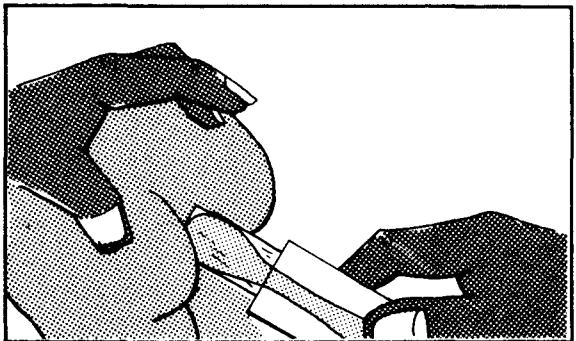


3. Décoller doucement le ruban adhésif de la lame et le placer en boucle, sur le manche de la cuillère.

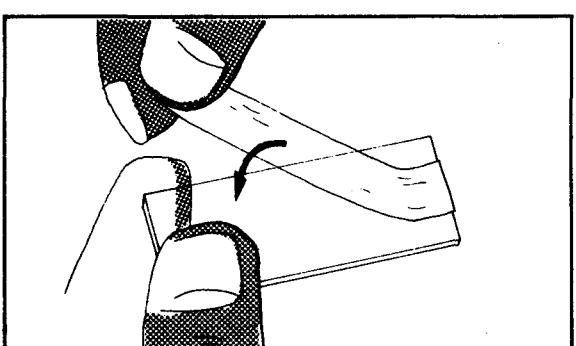
4. Prendre le tout dans la main droite, en tenant bien la lame contre la cuillère.



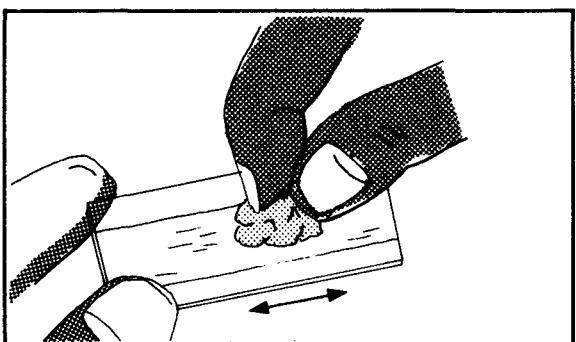
5. Ecartez les fesses du malade avec la main gauche. Presser fort l'extrémité de la cuillère, garnie du ruban adhésif autour de l'anus, en plusieurs endroits.



6. Prendre la lame et y replier la boucle de ruban adhésif, côté adhésif contre la lame.



7. Bien s'assurer que le ruban adhésif colle à la lame en pressant avec un tampon de coton.



8. En réduisant l'ouverture du condenseur et en utilisant l'objectif 10 x, rechercher la présence d'œufs d'*E. vermicularis*, qui ont les caractéristiques suivantes:

Forme: ovale, mais asymétrique (aplati d'un côté, bombé de l'autre)

Taille: 50 à 60 µm

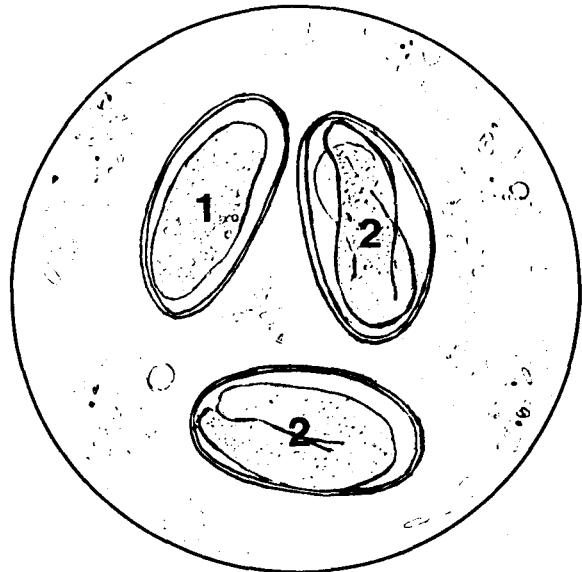
Coque: lisse et fine, mais à double ligne bien nette

Contenu: soit une masse granuleuse (1), soit un embryon de ver replié (2)

Couleur: transparent, incolore.

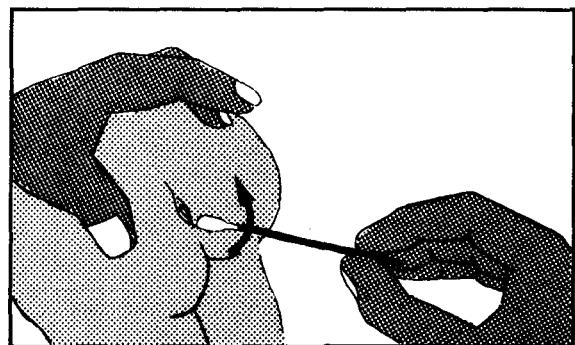
Pour les photos des œufs, se reporter à la page 129.

(D'après la méthode de Melvin D. et Brooke M., *Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites*. Atlanta, US Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1969, p. 138).

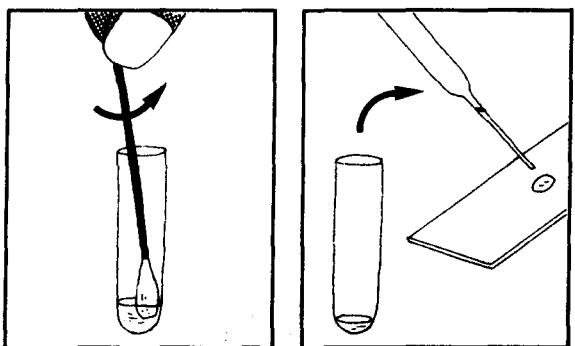


Si l'on n'a pas de ruban adhésif

1. Utiliser un écouvillon-coton.
2. Frotter le pourtour de l'anus (mais pas l'intérieur) avec l'écouvillon.



3. Tremper l'écouvillon dans un tube à hémolyse contenant environ 0,5 ml (10 gouttes) de soluté physiologique (réactif No. 47). Bien agiter l'écouvillon dans le soluté.
4. Prélever le soluté à la pipette Pasteur. L'examiner entre lame et lamelle au microscope, comme il est décrit ci-dessus sous 8 (page 118).



4. Oeufs et larves de parasites intestinaux

A. CARACTÉRISTIQUES DES ŒUFS

Les œufs pondus par les vers parasites trouvés dans les selles sont identifiés par:

- leur taille
 - leur forme
 - leur coque
 - leur contenu
- et parfois par
- leur couleur, ou par
 - certains signes distinctifs.

Par exemple: œufs de *Schistosoma mansoni*

Taille: 150 µm

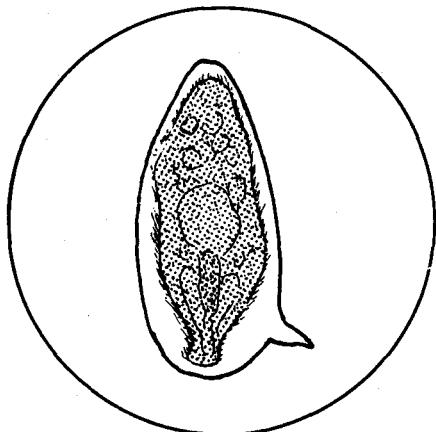
Forme: ovoïde

Coque: enveloppe externe mince et gonflée; enveloppe interne fine, membraneuse et moins nette

Contenu: un embryon cilié

Couleur: jaune clair

Signe distinctif: un éperon latéral

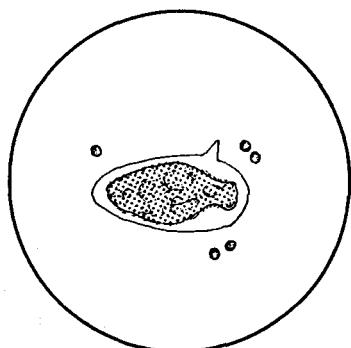


B. TAILLE DES ŒUFS

La taille peut être estimée par rapport à celle d'une hématie, qui mesure 7,5 à 8 µm.

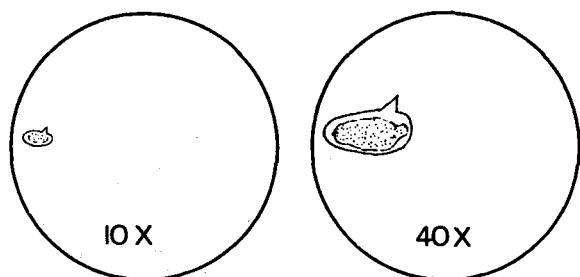
$$1 \text{ micromètre (} 1 \mu\text{m} \text{)} = \frac{1}{1000} \text{ de mm}$$

La taille en µm indiquée dans le Manuel est mesurée dans le sens de la longueur.



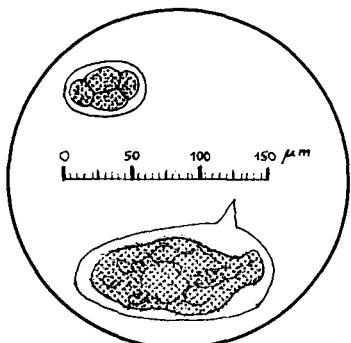
La taille peut également être estimée par rapport au champ microscopique:

- à l'objectif 10 x, l'œuf occupe 1/10 du champ
- à l'objectif 40 x, l'œuf occupe 1/3 du champ.



De plus, l'œuf peut être mesuré par rapport à une échelle micrométrique placée dans l'oculaire du microscope.

On peut aussi le comparer à une autre espèce d'œuf très répandue dans le pays et qu'on a l'habitude de voir au microscope (œuf d'ankylostome, d'ascaris, etc.).



COMMENT RECONNAÎTRE LES ŒUFS

La méthode conseillée est la suivante:

- (a) reconnaître l'identité probable de l'œuf d'après son apparence générale
- (b) rechercher systématiquement toutes les caractéristiques pour en confirmer l'identité.

Pour s'entraîner, si possible avec l'aide d'un instructeur:

- examiner les différents œufs que l'on trouve dans la région
 - s'exercer à retrouver *une à une* chacune des caractéristiques mentionnées dans ce Manuel pour les œufs des espèces en question.
-

LISTE ALPHABÉTIQUE DES PARASITES DONT LES ŒUFS PEUVENT ÊTRE DÉCOUVERTS DANS LES SELLES

Ordre alphabétique

Les œufs sont classés par ordre alphabétique, et non par taille, forme ou autres caractères distinctifs, car les méthodes d'identification par élimination successive pourraient induire en erreur des techniciens inexpérimentés.

Numéro d'ordre

Un numéro correspondant à l'ordre alphabétique a été attribué à chaque espèce; les œufs sont décrits et illustrés dans cet ordre. On trouvera ensuite un tableau global (pages 140 et 141) permettant de trouver plus rapidement le type d'œuf recherché.

Région du monde

On a indiqué pour chaque œuf la région du monde où il est le plus courant. Lorsqu'on croit avoir découvert une espèce rare, ne pas manquer de consulter cette liste afin d'éviter les erreurs.

NOM SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL (le 1er nom indique le genre, le 2ème l'espèce)	NOM ORDINAIRE (français)
● 1. <i>Ancylostoma duodenale</i>	Ankylostome
● 2. <i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascaris
3. <i>Clonochis sinensis</i>	Douve de Chine
4. <i>Dicrocoelium</i> (diverses espèces)	Petite douve
5. <i>Diphyllobothrium latum</i>	Bothriocéphale (Ténia des poissons)
6. <i>Dipylidium caninum</i>	Ténia du chien
7. <i>Enterobius vermicularis</i>	Oxyure
8. <i>Fasciola hepatica</i> (ou <i>gigantica</i>)	Grande douve du foie
9. <i>Fasciolopsis buski</i>	Grande douve de l'intestin
10. <i>Heterophyes heterophyes</i>	Petite douve d'Orient
11. <i>Hymenolepis diminuta</i>	Ténia du rat
●12. <i>Hymenolepis nana</i>	Ténia nain
●13. <i>Necator americanus</i>	Ankylostome (2ème variété)
14. <i>Metagonimus yokogawai</i>	Douve du Japon
15. <i>Opisthorchis felineus</i>	Douve du chat
16. <i>Paragonimus westermani</i> *	Douve du poumon
17. <i>Schistosoma bovis</i>	—
●18. <i>Schistosoma haematobium</i> **	Schistosome vésical
●19. <i>Schistosoma intercalatum</i>	Schistosome rectal
●20. <i>Schistosoma japonicum</i>	Schistosome artério-veineux
●21. <i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosome intestinal
●22. <i>Strongyloides stercoralis</i> ***	Anguille
23. <i>Taenia saginata</i>	Ténia du bœuf
24. <i>Taenia solium</i>	Ténia du porc
25. <i>Trichostrongylus</i> (diverses espèces)	Trichostrongylidés
●26. <i>Trichuris trichiura</i>	Trichocéphale

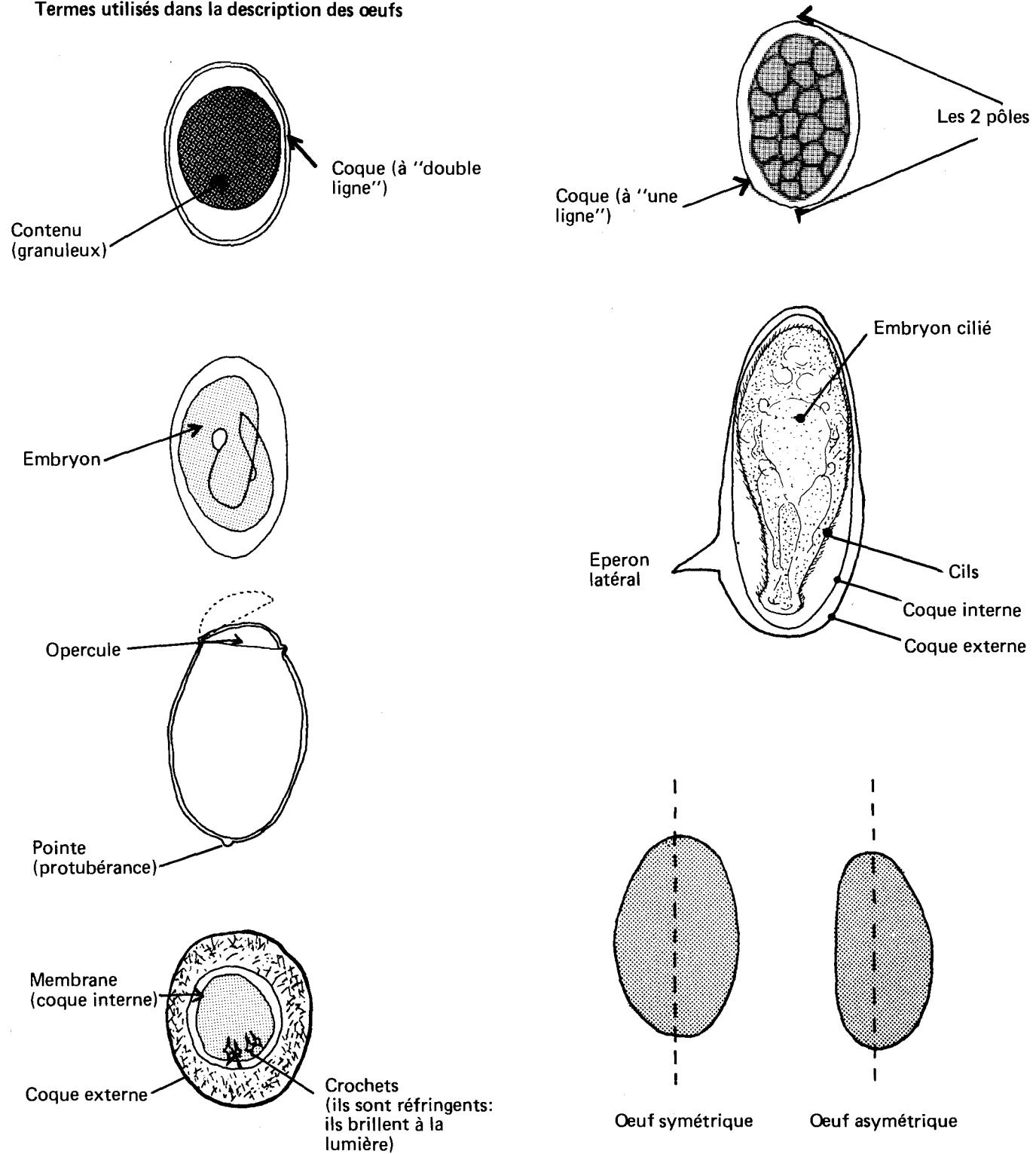
● = les plus courants dans de nombreux pays

* trouvé surtout dans les crachats

** trouvé surtout dans les urines

*** trouvé surtout sous forme de larve dans les selles

Termes utilisés dans la description des œufs



$$1 \text{ } \mu\text{m} (\text{micromètre}) = \frac{1}{1000} \text{ de millimètre}$$

1 hématie mesure environ 8 μm

Principales caractéristiques permettant d'identifier les œufs des helminthes les plus répandus dans les régions tropicales

œufs operculés	petits <35 µm contenant des larves développées	extension prononcée du bord de la coque, petite protubérance au pôle élargi de l'œuf	— <i>Clonorchis sinensis</i> (3)
	très gros > 130 µm	— <i>Fasciolopsis buski</i> (9) — <i>Fasciola hepatica</i> (8)	
œufs non operculés	gros > 50 µm sans larves développées	moyens 70–120 µm opercule bien distinct, aplati, avec bord visible, couleur jaune doré	— <i>Paragonimus westermani</i> (16)
	larves ciliées, éperon bien visible ou protubérance peu marquée	protubérance peu marquée — <i>Schistosoma japonicum</i> (20)	
		éperon terminal — <i>Schistosoma haematobium</i> (18)	
		éperon latéral — <i>Schistosoma mansoni</i> (21)	
œufs non operculés	œufs comportant trois paires de crochets	une seule coque épaisse brun foncé, stries transversales, sphérique ou subsphérique	— <i>Taenia</i> (23–24)
		coque double, coque interne incolore avec filaments aux pôles, ovale	— <i>Hymenolepis nana</i> (12)
œufs sans crochets	pas de larves ciliées, pas d'éperon, pas de protubérance	coque double, coque externe brun foncé en forme de citron, 2 bouchons aux pôles, coque lisse	— <i>Trichuris trichuria</i> (26)
		ovoïde, pas de bouchons aux pôles, coque externe couverte de mamelons	— <i>Ascaris lumbricoides</i> (2)
		œufs sans crochets	— <i>Enterobius vermicularis</i> (7)
		coque mince, claire, transparente	larves aplatis à un bout non aplatis — <i>Strongyloides stercoralis</i> (22)
			cellules grises — <i>Necator americanus</i> (13) — <i>Ancylostoma duodenale</i> (1)

1. *Ancylostoma duodenale*

Taille 50 à 60 µm

Forme ovale avec des pôles arrondis et un peu aplatis (souvent un pôle est un peu plus aplati que l'autre)

Coque très fine, dessinée comme une ligne noire

Couleur les cellules du contenu sont gris clair, le Lugol les fait virer au brun foncé

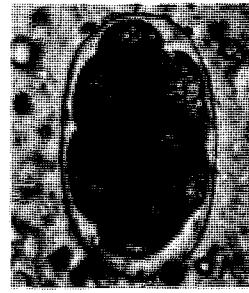
Contenu variable suivant le stade de maturation de l'oeuf.

Type A (selles fraîches):

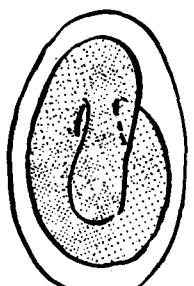
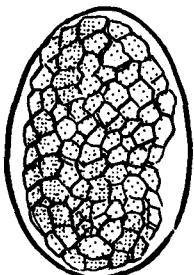
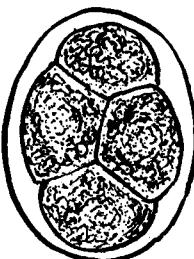
4, 8 ou 16 cellules grises granuleuses, claires mais non réfringentes (blastomères).



A



B



Type B (selles de quelques heures):

Masse unique formée de nombreuses petites cellules grises granuleuses.

Type C (selles vieilles – 12 à 48 heures):

L'oeuf est entièrement rempli par une petite larve (le futur ver), enroulée sur elle-même. Il est "embryonné".



C

Ascaris

Monde entier

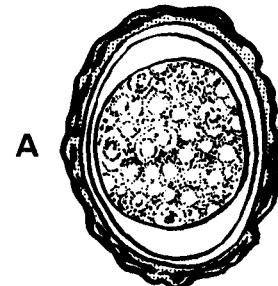
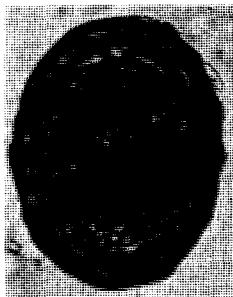
2. *Ascaris lumbricoides*

On peut trouver 4 types d'œufs d'ascaris:

- A. Oeuf fécondé à double coque
- B. Oeuf non fécondé à double coque
- C. Oeuf fécondé semi-décortiqué (plus rare)
- D. Oeuf non fécondé semi-décortiqué (très rare).

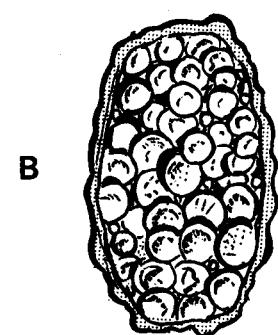
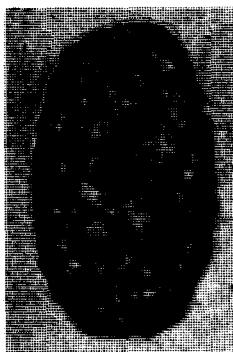
A. Oeuf fécondé à double coque

Taille	70 µm environ
Forme	ovale, parfois rond
Coque	deux coques distinctes: <ul style="list-style-type: none">— coque externe rugueuse, brune, couverte de petites bosses (mamelons)— coque interne lisse, épaisse, incolore
Couleur	la coque externe est brune, le contenu incolore ou jaune clair
Contenu	une masse centrale, unique, ronde et granuleuse.



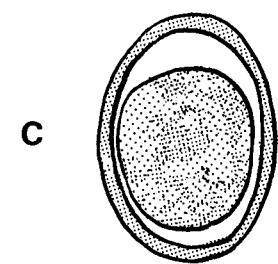
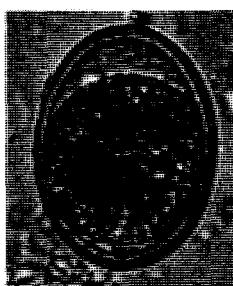
B. Oeuf non fécondé à coque double

Taille	80 à 90 µm environ (plus gros que le type A)
Forme	plus allongée (ellipsoïde ou irrégulière)
Coque	on distingue mal les 2 coques: <ul style="list-style-type: none">— coque externe brune, boursouflée, avec des bosses assez irrégulières— coque interne mince (selon les œufs, une ou deux lignes peuvent être visibles)
Contenu	l'oeuf est complètement rempli de grosses granulations rondes très réfringentes (brillantes).



C. Oeuf fécondé semi-décortiqué

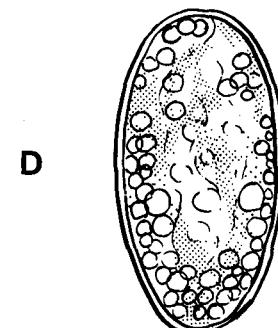
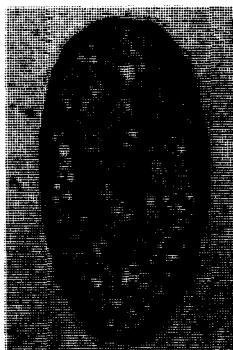
Identique à l'œuf A, mais sans coque externe.	
Coque	1 seule coque lisse, épaisse et incolore (ou jaune très pâle)
Contenu	une masse centrale unique, ronde, granuleuse, incolore.



D. Oeuf non fécondé, semi-décortiqué

Coque	1 seule coque lisse, mince, incolore (à double ligne)
Contenu	grosses granulations rondes, réfringentes, incolores.

Attention: Ne pas confondre cet œuf (D) avec un œuf d'*ankylostome* ou de grande douve.

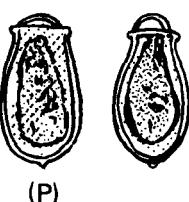
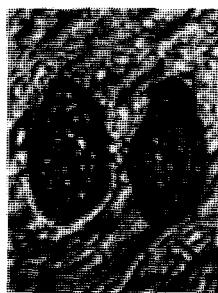


Douve de Chine

Asie

3. *Clonorchis sinensis*

Taille	25 à 30 µm
Forme	spéciale (voir illustration ci-contre)
Coque	assez fine et lisse, mais assez épaisse (double ligne)
Opercule	facilement visible au pôle le plus étroit de l'œuf, inséré dans un bord épaissi de la coque
Pointe	petite pointe au pôle élargi (P)
Contenu	embryon cilié bien organisé
Couleur	coque jaune-brun, contenu jaune pâle.



Small fluke

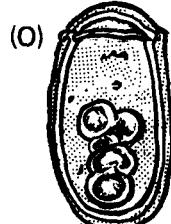
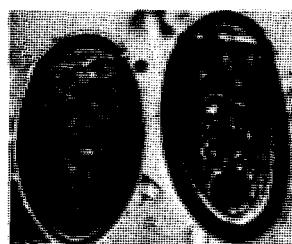
Monde entier

4. *Dicrocoelium* (diverses espèces)

Taille	45 à 50 µm
Forme	ovale, assez asymétrique
Coque	épaisse, lisse, de couleur jaune, orange ou brun clair
Opercule	bien visible (O).

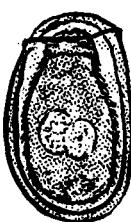
A. Oeufs de transit* (type le plus fréquent):

La coque est de couleur variable: jaune, orange ou brun clair. L'œuf contient une masse ovale peu nette, jaune foncé, avec souvent 1 à 4 globules réfringents.



B. Oeuf de sujet parasité (très rare):

La coque est d'un brun foncé uniforme. L'œuf contient un embryon cilié.



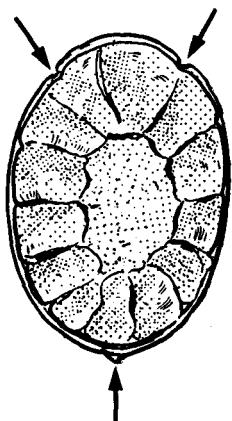
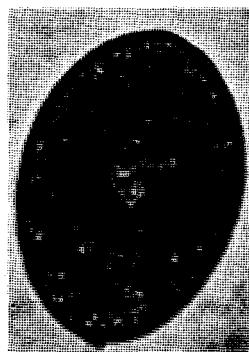
*Oeufs de transit: Le sujet a consommé du foie de mouton ou de bœuf infecté par les douves. Les œufs de ces vers ne sont pas digérés et apparaissent dans ses selles, mais il n'est pas infecté. Refaire l'examen 8 jours plus tard en lui demandant de ne manger dans l'intervalle ni foie ni produits à base de foie.

Bothriocéphale

Pays froids (particulièrement)

5. *Diphyllobothrium latum*

Taille	70 µm
Forme	bien ovale
Coque	lisse et mince
Opercule	peu visible s'il n'est pas soulevé
Pointe	très petite, située au pôle opposé à l'opercule
Contenu	amas de petites cellules autour d'une grande cellule centrale
Couleur	jaune clair.



6. *Dipylidium caninum*

Les œufs sont groupés en paquets de 6 à 20 dans un sac à membrane fine.

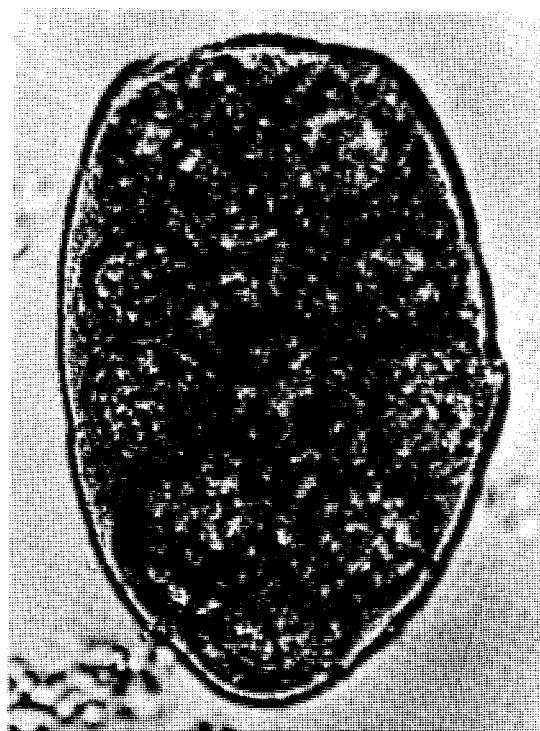
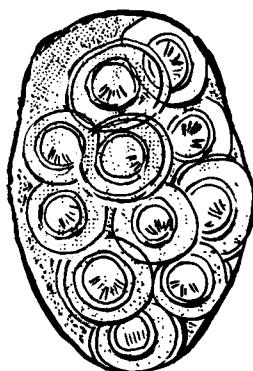
Taille du sac: 150 à 300 µm
de l'œuf: 30 à 40 µm

Forme ronde

Coque chaque œuf a une coque épaisse, un peu granuleuse, mais sans stries

Contenu une masse unique, granuleuse, avec 3 paires de crochets réfringents disposés en éventail

Couleur jaune ou gris pâle.

**7. *Enterobius vermicularis***

Taille 50 à 60 µm

Forme ovale, mais nettement asymétrique (aplati d'un côté, bombé de l'autre)

Coque lisse, fine mais double ligne visible

Contenu A) soit une petite masse granuleuse se présentant comme un ovale irrégulier, B) soit un embryon du ver, c.-à-d. une petite larve repliée

Couleur transparent, incolore.

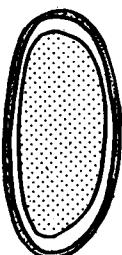
L'œuf est généralement trouvé dans les replis cutanés du pourtour de l'anus (voir page 119).

Oxyure

Monde entier



A



B



8. *Fasciola hepatica* (ou *gigantica**)

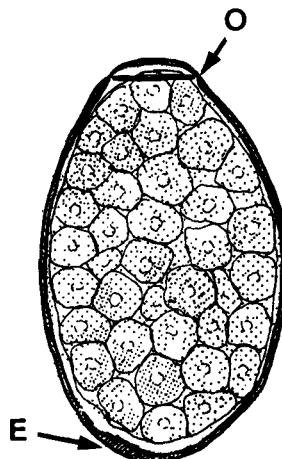
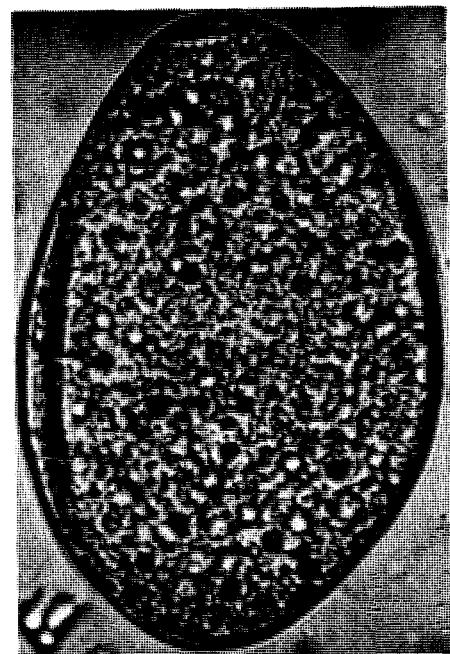
Taille	<i>F. hepatica</i> – 130 µm <i>F. gigantica</i> – 150 µm
Forme	ovale, pôles bien arrondis
Coque	lisse et fine, avec double ligne
Contenu	massif de grosses cellules peu nettes présentant chacune un noyau clair, granuleux (faire varier la vis micrométrique pour modifier la mise au point)
Couleur	jaune à brun foncé
Signe distinctif	opercule (O) finement marqué à un pôle avec rétrécissement de la paroi plus ou moins visible; épaissement (E) de la paroi, sur une petite portion, à l'autre pôle.

Les œufs sont assez rares dans les selles. (Dans les cas douteux on peut les rechercher par tubage duodénal.) Les cas de transit sont peu fréquents.

**F. gigantica*: pays tropicaux d'Afrique et d'Asie

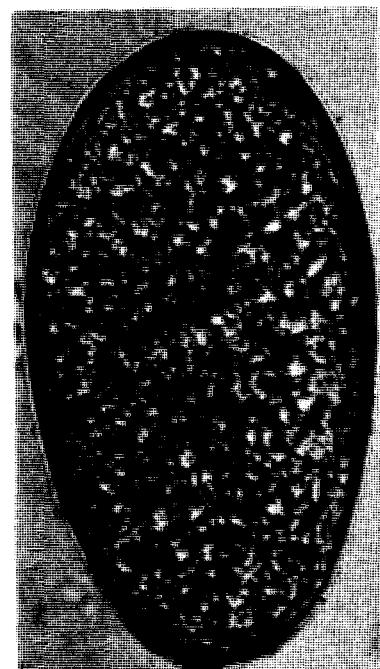
Grande douve du foie

Monde entier



Grande douve de l'intestin

Asie

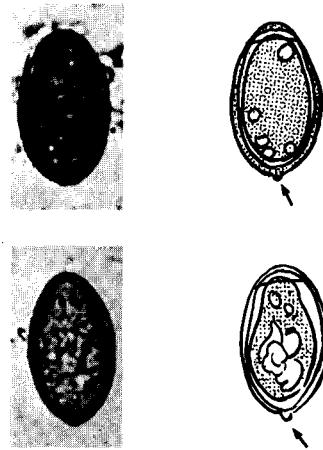


9. *Fasciolopsis buski*

Taille	140 µm
Forme	ovale
Opéricle	un peu plus petit (O) que celui de <i>F. hepatica</i>
	Ressemble beaucoup à l'œuf de <i>F. hepatica</i> , mais présente quelques différences:
(a) Coque	plus mince, à 1 seule ligne, avec un épaissement net de la paroi au pôle opposé à celui de l'opercule
(b) Contenu	les cellules peuvent être réfringentes avec une cellule claire au milieu de l'œuf
(c) Quantité	œufs souvent nombreux dans les selles.

Asie
(surtout) 

Petite douve d'Orient



10. *Heterophyes heterophyes*

Oeuf ressemblant à celui de *Clonorchis sinensis*

<i>Taille</i>	25 à 30 µm
<i>Forme</i>	plus ovale; opercule sans rebords
<i>Couleur</i>	jaune-brun foncé
<i>Coque</i>	un peu plus épaisse que celle de <i>C. sinensis</i>
<i>Pointe</i>	minuscule comme une verrue à peine visible au pôle élargi de l'œuf; souvent invisible
<i>Contenu</i>	masse cellulaire avec parfois de grosses granulations réfringentes (œuf non fécondé) ou un embryon cilié.

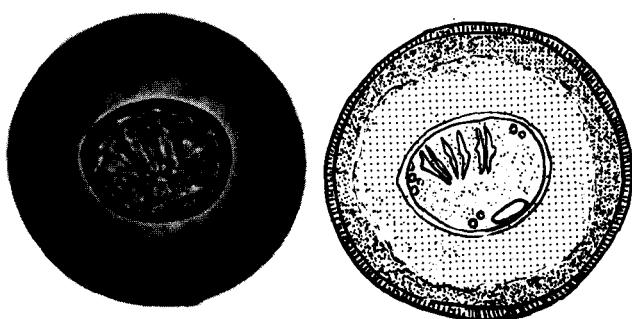
Ténia du rat

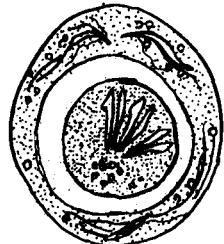
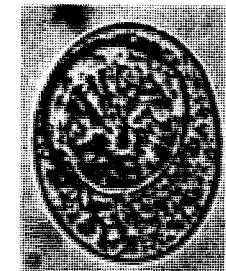
Monde entier 

11. *Hymenolepis diminuta*

Espèce rare (selles d'enfants)

<i>Taille</i>	70 à 80 µm (nettement plus gros qu' <i>H. nana</i>)
<i>Forme</i>	ronde
<i>Couleur</i>	transparent ou jaune clair
<i>Coque</i>	très épaisse: <ul style="list-style-type: none"> — coque externe mince avec stries transversales — coque interne très large, sans filaments
<i>Contenu</i>	un embryon arrondi qui contient 6 crochets disposés en éventail.





12. *Hymenolepis nana*

Taille	45 à 50 µm
Forme	ovale, presque arrondie
Coque	double, très épaisse, souvent plus épaisse à un pôle qu'à l'autre, avec des filaments qui partent des 2 pôles (réduire l'éclairage pour les voir), mêlés à des granulations entre les deux membranes
Couleur	gris très clair
Contenu	masse arrondie, embryon entouré d'une fine membrane avec 6 crochets réfringents disposés en éventail et quelques granulations bien marquées souvent groupées au centre.

Attention: Il est important de préciser si les œufs sont nombreux ou non.

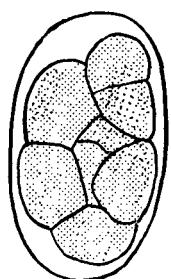
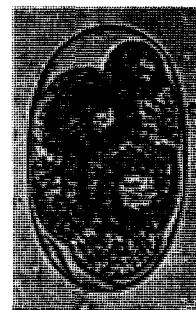
13. *Necator americanus*

Cet œuf est presque identique à celui d'*Ancylostoma duodenale*.

Taille	un peu plus long (70 µm)
Forme	pôles un peu plus aplatis
Contenu	contient toujours au moins huit cellules (jamais 4 comme celui d' <i>A. duodenale</i> dans les selles fraîches).

Ankylostome

Pays chauds



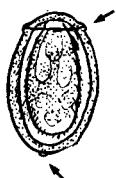
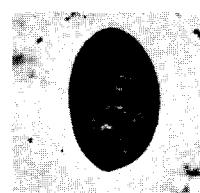
14. *Metagonimus yokogawai*

Oeuf ressemblant à ceux de *Clonorchis sinensis* et de *Heterophyes heterophyes*.

Taille	25 à 30 µm
Forme	ovale, sans renflement marqué
Coque	assez épaisse (la plus épaisse des trois variétés)
Opercule	plus arrondi que celui de <i>H. heterophyes</i> , rebords moins marqués que dans le cas de <i>C. sinensis</i>
Pointe	à l'autre pôle, minuscule ou invisible
Contenu	embryon cilié.

Douve du Japon

Extrême-Orient



Douve du chat

Asie
(surtout)

15. *Opisthorchis felineus*

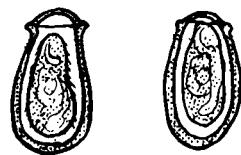
Oeuf ressemblant également à celui de *C. sinensis*.

Taille identique (25 à 30 µm)

Contenu embryon cilié.

Quelques différences:

- (a) *Forme* un peu moins élargie à sa base, moins renflée; certains œufs sont asymétriques
- (b) *Opercule* rebords moins marqués
- (c) *Pointe* presque toujours invisible.



Il est très difficile de différencier les œufs des quatre douves d'Orient:

Clonorchis sinensis forme renflée, opercule à rebords nets

Heterophyes heterophyes forme renflée, coloration plus foncée

Metagonimus yokogawai coque plus épaisse

Opisthorchis felineus forme étroite, souvent asymétrique, pointe invisible.

Douve du poumon

Extrême-Orient
(Afrique centrale)

16. *Paragonimus westermani*

Oeufs surtout trouvés dans les crachats (mais, avalés, ils passent dans les selles).

Taille 100 µm (plus petit que l'œuf de grande douve)

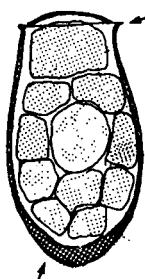
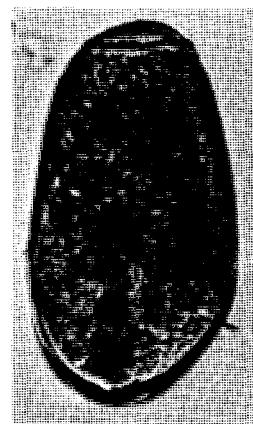
Forme ovale, avec souvent un côté un peu aplati

Opercule bien net, avec un rebord très visible (comme un petit chapeau aplati)

Coque épaississement marqué au niveau du pôle opposé à celui de l'opercule

Couleur brun doré

Contenu espace central clair entouré de cellules carrées.



Afrique
(Sud du Sahara)

17. *Schistosoma bovis*

Oeufs trouvés dans les selles de personnes ayant consommé de la viande de bœuf infectée.

Taille très grande (200 µm)

Forme en fuseau, extrémités minces se prolongeant au-delà de l'embryon

Eperon terminal, long

Contenu petit embryon, rond, placé au centre de l'œuf qu'il ne remplit pas

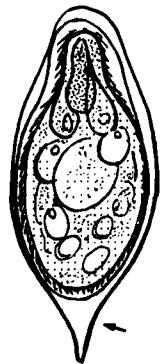
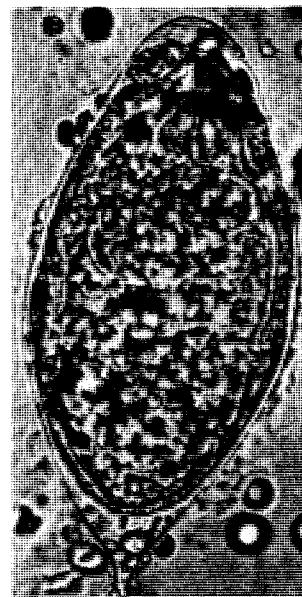
Ce ver n'est pas pathogène pour l'homme.

Echelle réduite de moitié



Schistosome (vésical)

Afrique
Méditerranée de l'Est



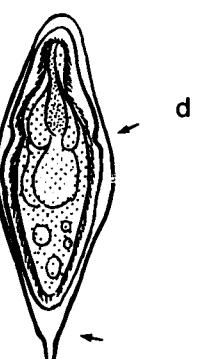
18. *Schistosoma haematobium*

Oeufs trouvés dans les urines (pour la recherche dans les urines, voir page 178) et parfois dans les selles.

Taille	120 à 150 µm
Forme	ovoïde, un pôle bien arrondi
Eperon	terminal, situé à l'autre pôle
Coque	lisse, très mince
Couleur	gris ou jaune clair
Contenu	un embryon bien formé, cilié, large, entouré d'une membrane (coque interne).

Schistosome (rectal)

Afrique



19. *Schistosoma intercalatum*

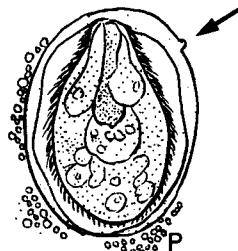
Oeuf d'aspect très voisin de celui de *S. haematobium*, mais trouvé dans les selles.

Il y a quelques différences:

Taille	un peu plus grande (150-180 µm)
Eperon	terminal, un peu long et effilé
Forme	en forme de fusain — un peu moins large (bords aplatis, surtout vers le pôle arrondi)
Contenu	embryon cilié entouré par une membrane qui présente 2 dépressions (d) ou enfoncements, une sur chaque bord, à hauteur du centre de l'oeuf.

Schistosome (artério-veineux)

Extrême-Orient

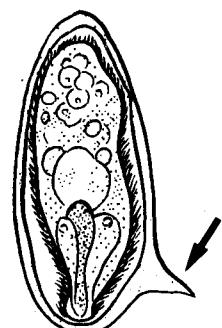


20. *Schistosoma japonicum*

Taille	70 à 80 µm
Forme	ovale, presque ronde
Couleur	transparent ou jaune clair
Eperon	difficile à voir: latéral et très petit, il peut être caché par des précipités granuleux abondants (P) qui sont souvent situés à la surface de l'oeuf
Contenu	large embryon cilié.

Schistosome (intestinal)

Afrique (Sud du Sahara)
Amérique tropicale

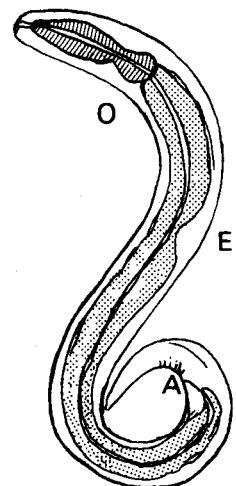


21. *Schistosoma mansoni*

Taille	150 µm (= 3 œufs d' <i>ankylostome</i>)
Forme	ovoïde, un pôle bien arrondi et un pôle plus conique
Eperon	latéral, au-dessus du pôle arrondi; grand et triangulaire (si l'éperon est caché sous la face inférieure, faire varier la vis micrométrique du microscope)
Coque	lisse, très fine
Couleur	jaune clair
Contenu	un embryon large, cilié, entouré d'une membrane, comme pour tous les <i>schistosomes</i> .

Anguillule

Pays
chauds



22. *Strongyloides stercoralis*: A. Larves

Les larves sont très mobiles dans les selles.

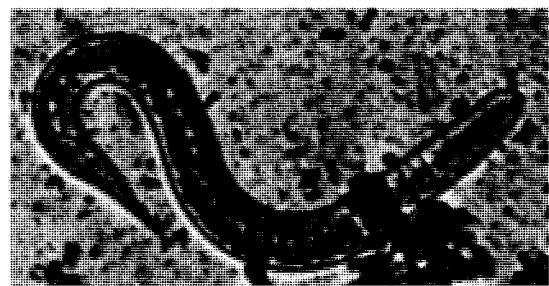
Taille 200 à 300 µm de long, 15 µm d'épaisseur

Queue moyennement effilée

Bouche courte

Tube digestif bien visible avec, au début, un œsophage (O) à 2 renflements et un pore anal (A) à l'autre extrémité

Ebauche génitale espace clair arrondi sur un bord, dans la région centrale de la larve (E).



Strongyloides stercoralis: B. Oeufs

Les œufs d'anguillules sont rarement trouvés dans les selles moulées, car ils éclosent avant leur évacuation pour donner les larves décrites ci-dessus. Mais on peut les rencontrer dans les selles liquides (et parfois dans les selles moulées de malades porteurs de souches particulières).

Oeuf d'aspect très voisin de celui de l'*ankylostome*.

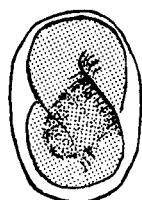
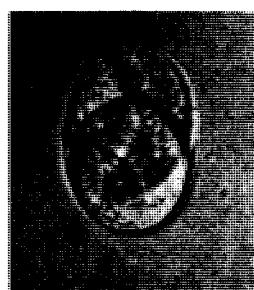
Taille 50 µm (un peu plus petit)

Forme comme l'œuf d'*ankylostome*

Coque comme l'œuf d'*ankylostome*

Couleur comme l'œuf d'*ankylostome*

Contenu une larve épaisse, repliée une ou plusieurs fois sur elle-même et parfois mobile.



23. *Taenia saginata*

24. *Taenia solium**

Les œufs** de ces deux ténias sont pratiquement identiques. Ils peuvent être trouvés dans les selles. Les œufs de *T. saginata* peuvent aussi être prélevés dans les replis cutanés du pourtour de l'anus (voir page 119).

Taille 30 à 40 µm

Forme ronde

Coque très épaisse, lisse, avec des stries transversales (réduire l'éclairage)

Couleur — coque: jaune-brun foncé
— contenu: gris-jaune clair

Contenu masse ronde granuleuse entourée d'une fine membrane avec 3 x 2 crochets réfringents, en forme de bâtonnets (faire varier la vis micrométrique)

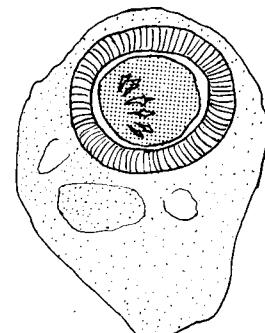
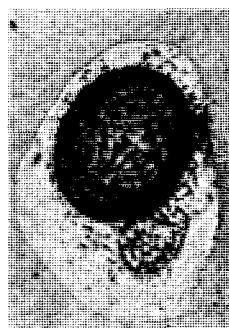
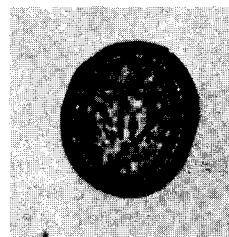
Sac extérieur l'œuf est parfois entouré d'un sac transparent flottant.

*L'infection à *Taenia solium* ne se rencontre guère que dans les régions à faible développement socio-économique d'Afrique centrale et australe, ainsi que d'Amérique latine et du sud de l'Asie.

**Le terme exact pour ces "œufs" est "embryophore": œuf embryonné qui a perdu son sac extérieur.

Ténia

Monde entier



25. *Trichostrongylus* (diverses espèces)

Assez voisin de l'œuf d'ankylostome

Taille 80 à 90 µm (un peu plus grand que *A. duodenale*)

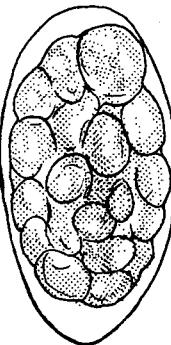
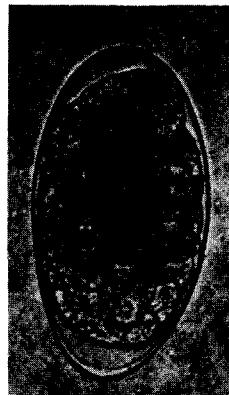
Forme ovoïde, asymétrique:
— un pôle arrondi
— un pôle plus étroit

Coque très fine, comme celle de l'ankylostome

Contenu dans les selles fraîches: masse d'au moins 20 petites cellules rondes et granuleuses. L'œuf se transforme rapidement en embryon.

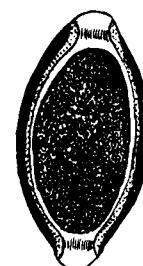
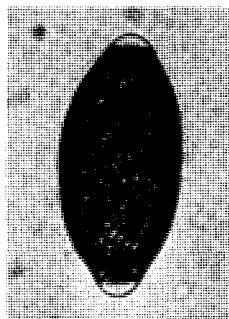
Trichostrongylidés

Asie



Trichocéphale

Monde entier



26. *Trichuris trichiura*

Taille 50 µm

Forme celle d'un citron

Coque assez épaisse, lisse, avec 2 couches

Couleur coque orange, contenu jaune

Signe distinctif un bouchon transparent arrondi à chaque pôle

Contenu une masse uniforme à aspect granuleux (parfois divisée, dans les selles vieilles)

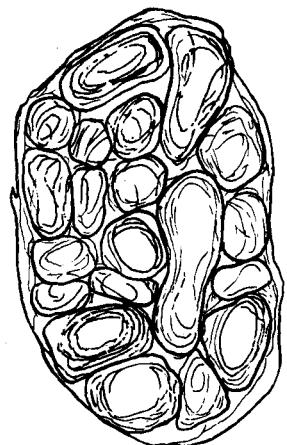
Attention: Il est important de préciser si les œufs sont nombreux ou pas.

NE PAS PRENDRE POUR DES ŒUFS

1. Cellules végétales à amidon

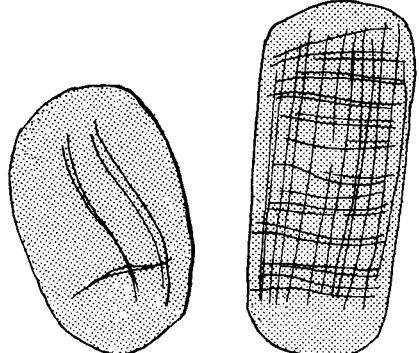
Taille 50 à 100 µm
Forme ronde ou ovale, allongée, mais avec contours *toujours déformés*, grossièrement bosselés
Coque épaisse par endroits, très irrégulière, avec des fissures
Couleur blanchâtre ou gris-jaune; le Lugol les fait virer au violet
Contenu boules d'amidon serrées les unes contre les autres.

Ces cellules proviennent de féculents tels que pommes de terre, haricots, ignames ou manioc.



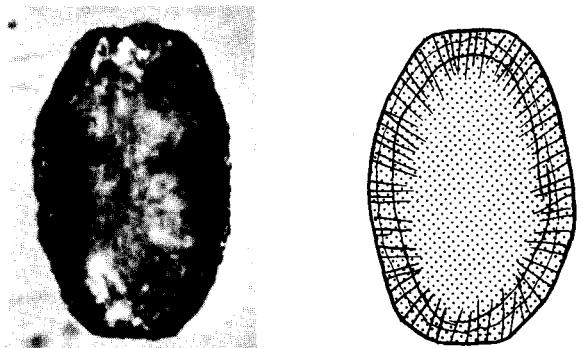
2. Fibres de viande digérée

Taille 100 à 200 µm
Forme ovale ou rectangulaire avec angles arrondis
Couleur jaune
Contenu transparent sans granulations, sans stries (ou avec des stries résiduelles quand la viande est mal digérée).



3. Savons

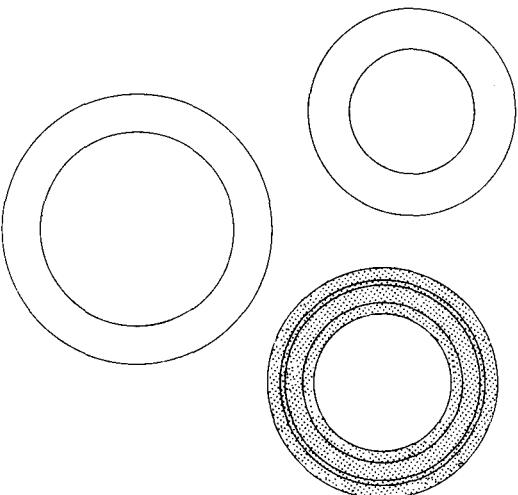
Taille 20 à 100 µm
Forme ronde, ovale ou irrégulière (aspect voisin de celui de la coupe d'un tronc d'arbre)
Couleur brun-jaune ou incolore
Contenu stries en rayons, visibles surtout sur les bords; centre vide.



4. Bulles d'air — gouttes d'huile

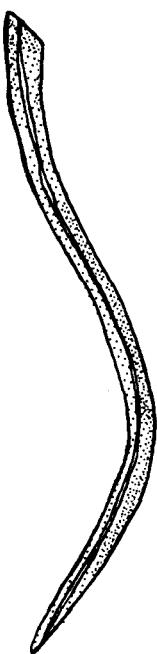
Taille très variable (toutes les tailles sont possibles)
Forme parfaitement ronde
Fausse coque anneau bien rond, très réfringent (formé de couches successives pour les gouttes d'huile)
Contenu vide.

Remarquer les tailles très différentes dans la préparation.



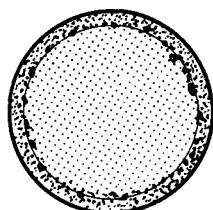
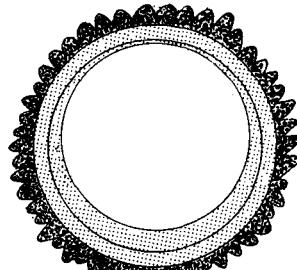
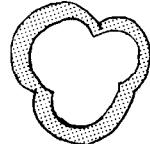
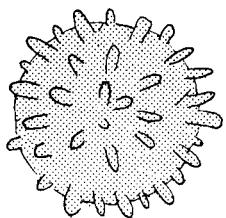
5. Poils végétaux

Taille	très variable (50 à 300 µm)
Forme	aspect assez rigide, souvent incurvé, élargi et coupé net à une extrémité, bien effilé à l'autre
Couleur	jaune clair
Contenu	canal central étroit et vide entre 2 couches réfringentes et transparentes.

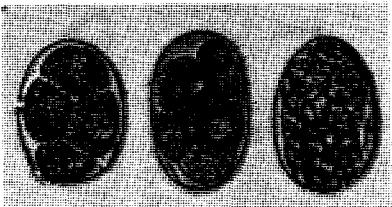
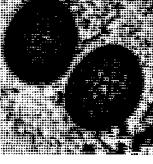
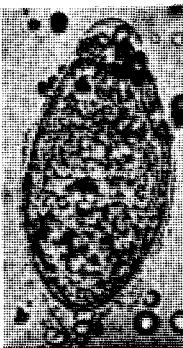
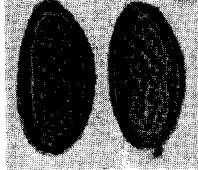
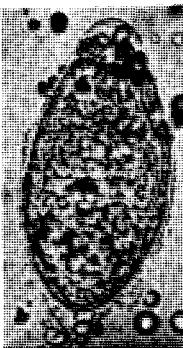
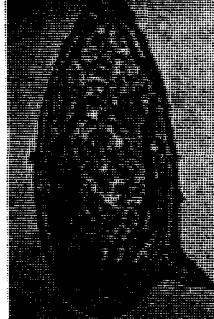


6. Grains de pollen et spores de champignons

Ils sont très variables suivant les régions du monde et l'alimentation. Leurs formes géométriques particulières, bien dessinées, leurs signes distinctifs (dents, mamelons ronds ou dentelés, etc.) permettent de ne pas les confondre avec les œufs de parasites.

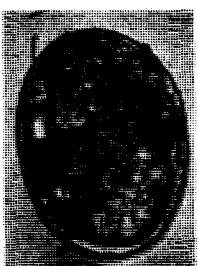
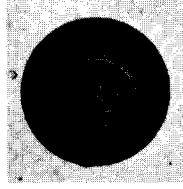
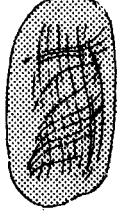
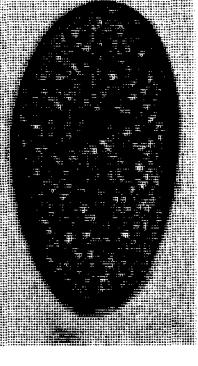


ŒUFS FRÉQUEMMENT RENCONTRÉS et objets avec lesquels il est facile de les confondre

	1 13		2		
	Ankylostome		Ascaris (fécondé)		Ascaris (non fécondé)
	Cellule végétale		Savon		Ascaris (fécondé; semi-décorqué)
26	12		23 24	7	
	Trichocéphale		<i>H. nana</i>		Ténia
		Oxyure			
18	21		22		
				Anguillule (larve)	
<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>			Poil végétal	

ŒUFS PLUS RARES

ŒUFS SPÉCIFIQUES DE L'ASIE

	4		4		20		3
	Petite douve (sujet infesté)		Petite douve (en transit)		<i>S. japonicum</i> (fréquent)		<i>C. sinensis</i> (fréquent)
	5 Bothriocéphale		11 <i>H. diminuta</i>		10 <i>H. heterophyes</i>		15 <i>O. felineus</i>
	22 Anguillule (œuf)		Fibre de viande		25 Trichostrongylidé		14 <i>M. yokogawai</i>
	19 <i>S. intercalatum</i>		16 Douve du poumon		8 Grande douve du foie		9 Grande douve de l'intestin

COMMENT EST-ON INFECTÉ PAR LES PARASITES INTESTINAUX?

Il est utile au technicien de laboratoire de savoir comment se produit l'infection par les divers parasites intestinaux, pour qu'il puisse donner des conseils d'hygiène à son entourage et éviter d'être lui-même contaminé, en particulier au laboratoire.

<i>Ankylostome</i>	en marchant pieds nus sur des terrains souillés par des selles; pour les enfants, en jouant dans la terre
<i>Ascaris</i>	en consommant des légumes crus, des salades mal lavées; pour les enfants, en jouant dans des terrains souillés
<i>Anguillule</i>	en marchant pieds nus sur des terrains souillés par des selles; par auto-infestation*; <i>au laboratoire</i> , au contact manuel des selles
<i>Bothriocéphale</i>	en consommant du poisson de lac ou de rivière insuffisamment cuit
<i>Douves:</i>	
— <i>grandes douves</i>	en consommant des salades mal lavées
— <i>douve du poumon</i>	en consommant des crabes de rivière insuffisamment cuits
— <i>petites douves</i>	en avalant des fourmis infectées (salades mal lavées, enfants jouant sur l'herbe)
— <i>douves d'Asie</i>	en consommant du poisson de rivière insuffisamment cuit
<i>Oxyure</i>	au contact d'individus infectés aux mains malpropres (enfants jouant entre eux) et par auto-infestation
<i>Schistosomes</i>	en se baignant dans des mares, des cours d'eau ou des marigots souillés par des selles ou des urines
<i>Ténias du bœuf et du porc</i>	en consommant de la viande infectée insuffisamment cuite
<i>Cysticerque du ténia du porc</i>	en consommant des légumes crus mal lavés ou par auto-infestation
<i>Ténia du chien</i>	en avalant des puces de chien infecté (enfants)
<i>Ténia nain</i>	en avalant des légumes souillés; au contact d'individus infectés par auto-infestation et <i>au laboratoire</i>
<i>Ténia du rat</i>	en avalant des puces de rat
<i>Trichocéphale</i>	en consommant des légumes ou des salades mal lavés
<i>Trichostrongylidés</i>	en consommant des salades mal lavées (Asie).

Protozoaires**

Entamoeba histolytica et *Giardia lamblia*

en buvant de l'eau souillée, en consommant des salades mal lavées, au contact de malades infectés aux mains malpropres et *au laboratoire* par défaut de propreté.

Balantidum coli en consommant des légumes mal lavés; au contact des porcs (élevages).

*Auto-infestation: le malade se contamine lui-même et entretient ainsi sa maladie.

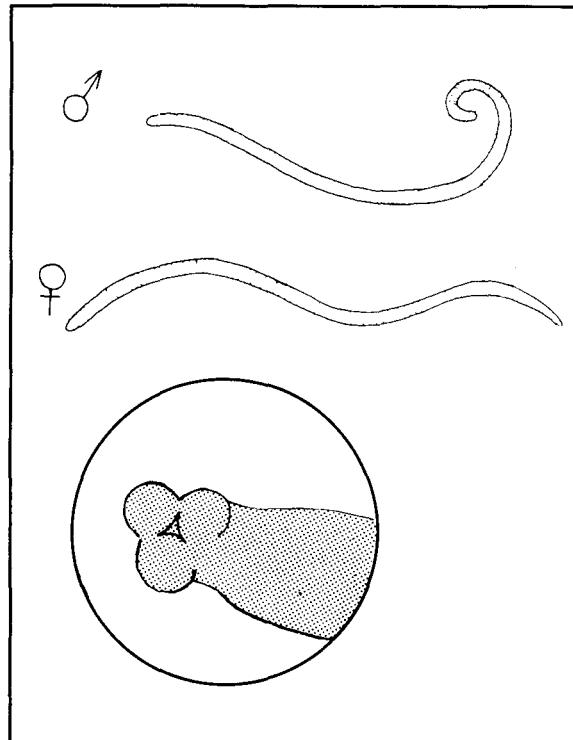
**Pour l'identification des protozoaires intestinaux, voir pages 147 et 155.

5. Vers adultes trouvés dans les selles

Les vers apportés au laboratoire pour identification sont trouvés dans les selles, les vêtements ou les draps, ou encore lors d'une intervention chirurgicale.

Se poser les questions suivantes:

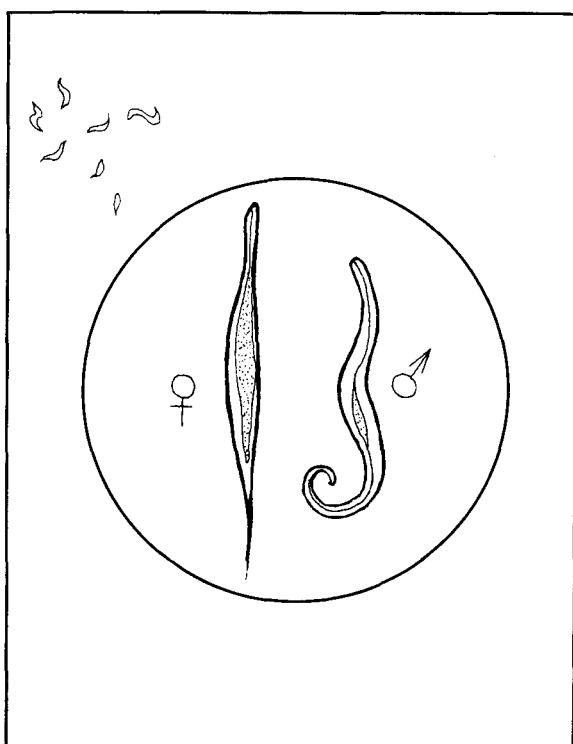
- quelle est leur longueur?
- quelle est leur forme?
- sont-ils plats? segmentés ou non?
- sont-ils cylindriques ou non?



A. VERS CYLINDRIQUES COURANTS

1. Grands vers ronds — Ascaris

Couleur rosâtre
Epaisseur 0,3 à 0,5 cm
Longueur mâle — environ 15 cm, queue enroulée
femelle — 20 à 25 cm, queue droite.



2. Petits vers ronds — Oxyures

Couleur blanche
Longueur femelle — 1 cm, queue très pointue
mâle — 0,5 cm (les mâles sont plus rares).

Ils apparaissent en grand nombre, surtout dans les selles d'enfants, et sont mobiles. On les trouve aussi autour de l'anus, dans les replis de la peau où l'on peut les recueillir à l'aide d'une bande de papier adhésif (voir page 119).

B. VERS PLATS SEGMENTÉS – TÉNIAS

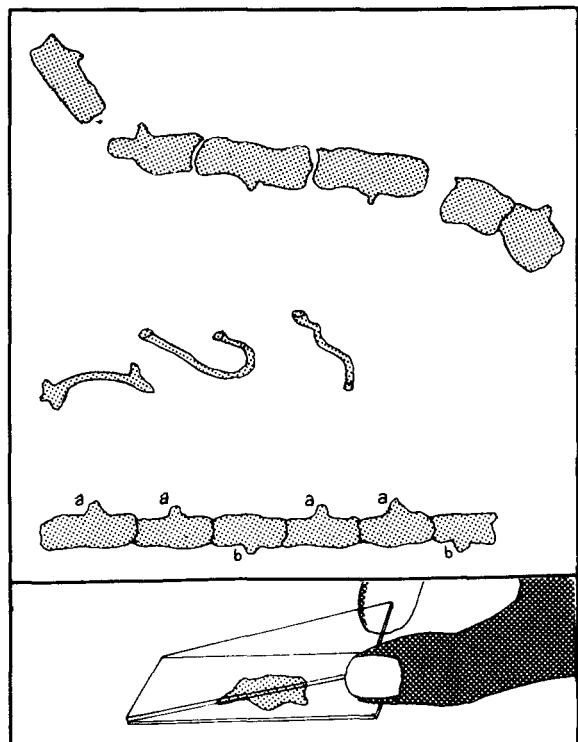
Couleur blanc ivoire ou bleu pâle
Longueur ensemble du ver: 3 à 10 m; mais ce sont des segments isolés, mûrs, ou des fragments en chaîne, de longueur très variable, qui sont généralement soumis à l'examen.

Attention

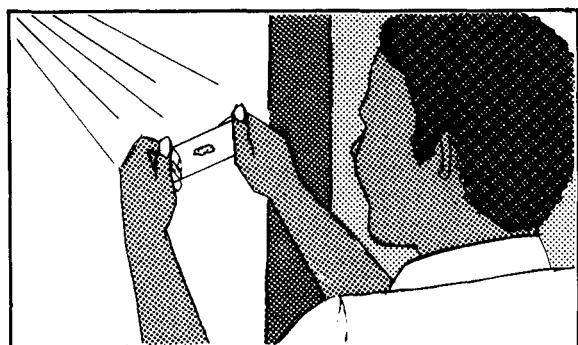
Si les échantillons ne sont pas examinés immédiatement, ils peuvent se dessécher et s'enrouler sur eux-mêmes; ils ressemblent alors à des vers ronds. En ce cas, les humidifier pour leur rendre leur forme.

Examiner

1. *la chaîne de segments* pour observer la disposition des pores latéraux.
2. *un seul segment* aplati délicatement entre deux lames.

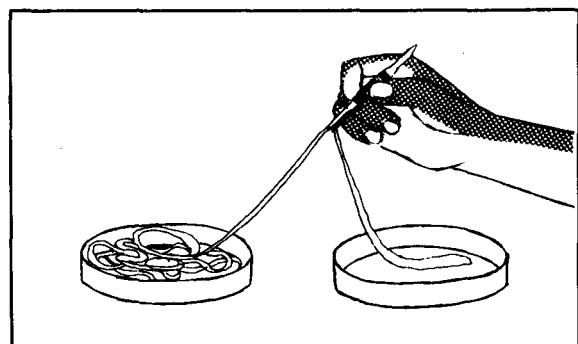


Regarder la lame à l'œil nu, face à une fenêtre, pour voir les branches utérines par transparence et les compter.

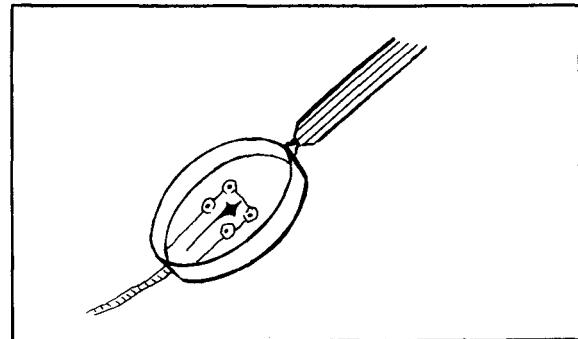


3. *la tête (scolex):*

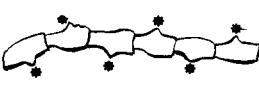
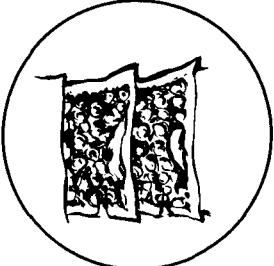
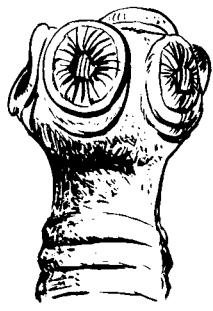
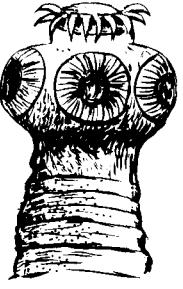
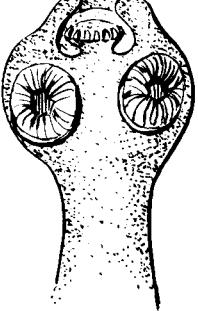
- placer le ver tout entier dans une boîte de Pétri remplie d'eau (ou sur une assiette)
- avec une pince, dévider peu à peu le ver dans une autre boîte; pour le démêler, aller de la partie large à la partie fine.



- si on voit, à la fin d'une partie très fine (le cou), une boule de la taille d'une petite tête d'épingle, l'examiner à la loupe ou au microscope (objectif 10 x). Il est rare que l'on puisse voir le scolex.



C. VERS PLATS – TÉNIAS – COMMENT LES IDENTIFIER?

Le plus fréquent	Moins fréquents		
TÉNIA DU BOEUF (<i>T. saginata</i>)	TÉNIA DU PORC (<i>T. solium</i>)	TÉNIA NAIN (<i>Hymenolepis nana</i>)	TÉNIA DU CHIEN (<i>Dipylidium caninum</i>)
Segments rectangulaires isolés trouvés dans les sous-vêtements et le lit. Ils sont expulsés par l'anus indépendamment des selles Ils proviennent d'un long ver intestinal de 3 à 5 mètres.	Petite chaîne de 3-4 segments rectangulaires trouvés dans les selles	Petit ver de 2 à 4 cm	Ver de 5 à 30 cm
			
Pores* irrégulièrement alternés	En général, pores régulièrement alternés	Pores tous du même côté	2 pores opposés par segment
Segment blanc ivoire de 1 à 2 cm 	Segment bleu pâle de 0,5 à 1,5 cm 	1 mm de large 	Segment rougeâtre de 0,3 à 0,5 cm 
Environ 20 branches utérines	Environ 10 branches utérines	Branches utérines peu visibles	2 bouquets de branches utérines
			
4 ventouses (2 mm de diamètre) Cou très fin	2 couronnes de crochets – 4 ventouses (1 mm de diamètre)	1 couronne de crochets rentrés – 4 ventouses (0,5 mm de diamètre)	4 couronnes de crochets sortis – 4 ventouses (0,5 mm de diamètre)

AUTRES ESPÈCES:

Le *Botriocéphale* est surtout trouvé dans les pays froids.

Le *Ténia échinocoque* est trouvé chez le chien; chez l'homme, on ne trouve que le Kyste hydatique.

D. AUTRES VERS

Ces vers sont très rarement rencontrés dans les selles. On en trouve parfois dans les organes d'un malade à l'occasion d'une opération chirurgicale. Les douves apparaissent dans le foie et les intestins.

Ankylostome

Petit ver cylindrique (comme un morceau de fil).

Longueur 1 à 1,5 cm

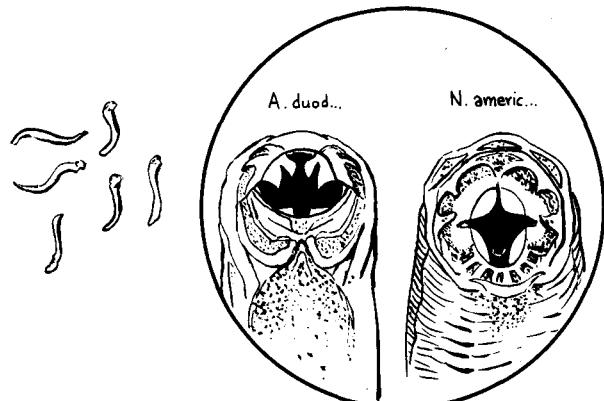
Couleur blanc, ou rouge s'il contient du sang.

Ressemble aux oxyures.

Examiner la tête au microscope (objectif 10 x).

Taille normale

A la loupe
(ou au microscope)



Trichocéphale

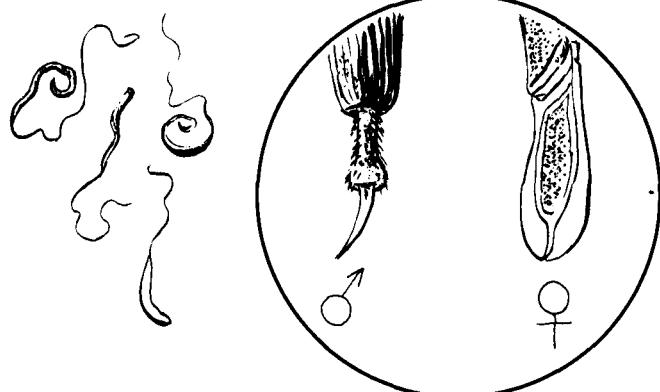
Petit ver fin.

Longueur 3 à 5 cm

Couleur blanc.

Ressemble à un petit fouet, les 2/3 du ver ayant l'aspect d'un fil à coudre prolongé par 1/3 plus large

Il vit dans la paroi du cæcum ou, parfois, du rectum.

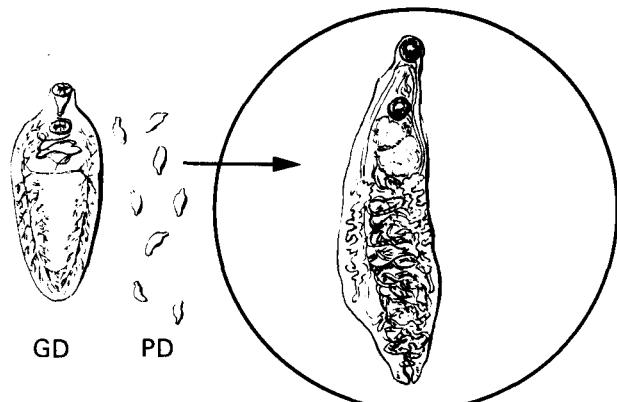


Douve

Ver plat, à 2 ventouses, ressemblant à une feuille d'arbre.

Grande douve 2 à 3 cm de long, assez large, brun-rouge ou blanc opaque (GD)

Petite douve 0,5 à 1 cm de long, plus étroite, gris-rouge translucide (PD).



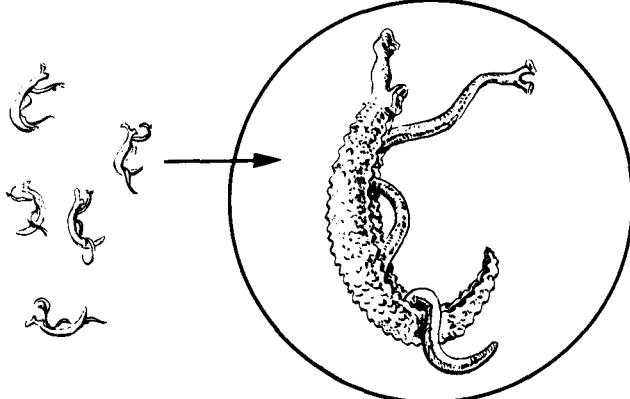
Schistosome

Petit ver fin et court

Longueur 0,5 à 1,5 cm

Couleur blanc.

Le mâle plat est enroulé autour de la femelle filiforme qui est un peu plus longue. Chaque ver a 2 ventouses, près de la tête.



6. Amibes, flagellés et ciliés : formes mobiles

Définitions

Les protozoaires sont des micro-organismes formés d'une seule cellule. On peut les trouver dans les selles sous leur forme mobile (trophozoïtes) ou sous forme de kystes.

Les trophozoïtes des protozoaires sont mobiles:

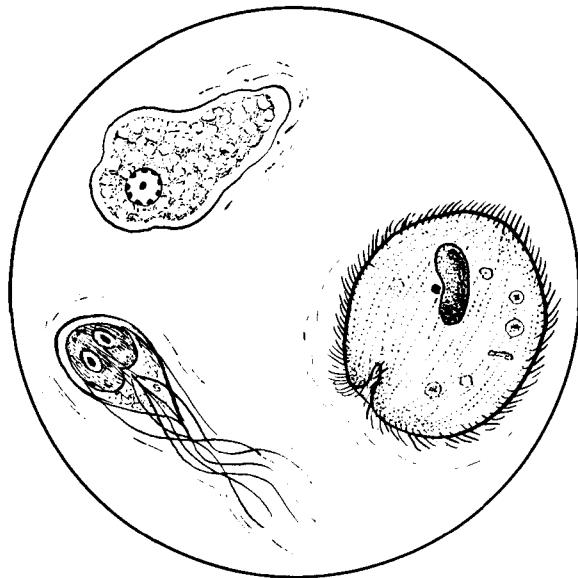
- soit parce que la cellule (amibe) se déplace lentement par elle-même
- soit parce qu'ils sont dotés d'organes de locomotion agités de mouvements vifs, les flagelles (sortes de long fouet) ou les cils (nombreux poils courts).

Les formes mobiles de protozoaires sont surtout trouvés dans:

- les selles liquides
- les selles contenant du mucus
- les selles molles non moulées.

Classification

Sans flagelles ni cils	AMIBES
Avec flagelles	FLAGELLÉS
Avec cils	CILIÉS



Préparation des lames d'examen

1. N'examiner que des selles fraîches (1 heure au plus; les amibes s'immobilisent très vite).
2. Lorsqu'on reçoit un lot de plusieurs échantillons de selles, commencer par examiner les selles les plus liquides, contenant du mucus.
3. Prélever un échantillon sur le pourtour de l'échantillon, dans une portion renfermant du mucus.
4. Examiner une préparation au soluté physiologique (réactif No. 47) (tiède, si la température ambiante est basse) ou examiner les selles pures si elles sont très liquides. Utiliser l'objectif 40 x.
5. Dans du Lugol (réactif No. 38), les trophozoïtes s'immobilisent. Le noyau est bien coloré mais la distinction entre trophozoïte et kyste peut être difficile.
6. Si l'on ajoute une goutte de solution physiologique d'éosine à 2% (réactif No. 24), cette solution colore tout le champ à l'exception des protozoaires (surtout les amibes) qui restent incolores et sont donc faciles à repérer.

Liste des protozoaires intestinaux

Certains protozoaires intestinaux sont pathogènes; d'autres le sont moins ou pas du tout. Ils se retrouvent tous dans le monde entier.

A. AMIBES

- | | |
|--|--|
| 1. <i>Entamoeba histolytica</i> | Cette amibe, qui peut provoquer la dysenterie ou des abcès, est la seule amibe généralement pathogène pour l'homme |
| 2. <i>Entamoeba coli</i> | Non pathogène, mais très répandue |
| 3. Autres amibes:
— <i>Entamoeba hartmanni</i>
— <i>Endolimax nana</i>
— <i>Iodamoeba butschli</i>
— <i>Dientamoeba fragilis</i> | Non pathogènes.
Leur identification exacte est difficile; elle n'est pas indispensable, il suffit que le laboratoire médical parvienne à bien les différencier d' <i>E. histolytica</i> . |

B. FLAGELLÉS

- | | |
|-------------------------------|----------------|
| 1. <i>Giardia lamblia</i> | Pathogène |
| 2. <i>Trichomonas hominis</i> | Non pathogène |
| 3. <i>Chilomastix mesnili</i> | Non pathogène. |

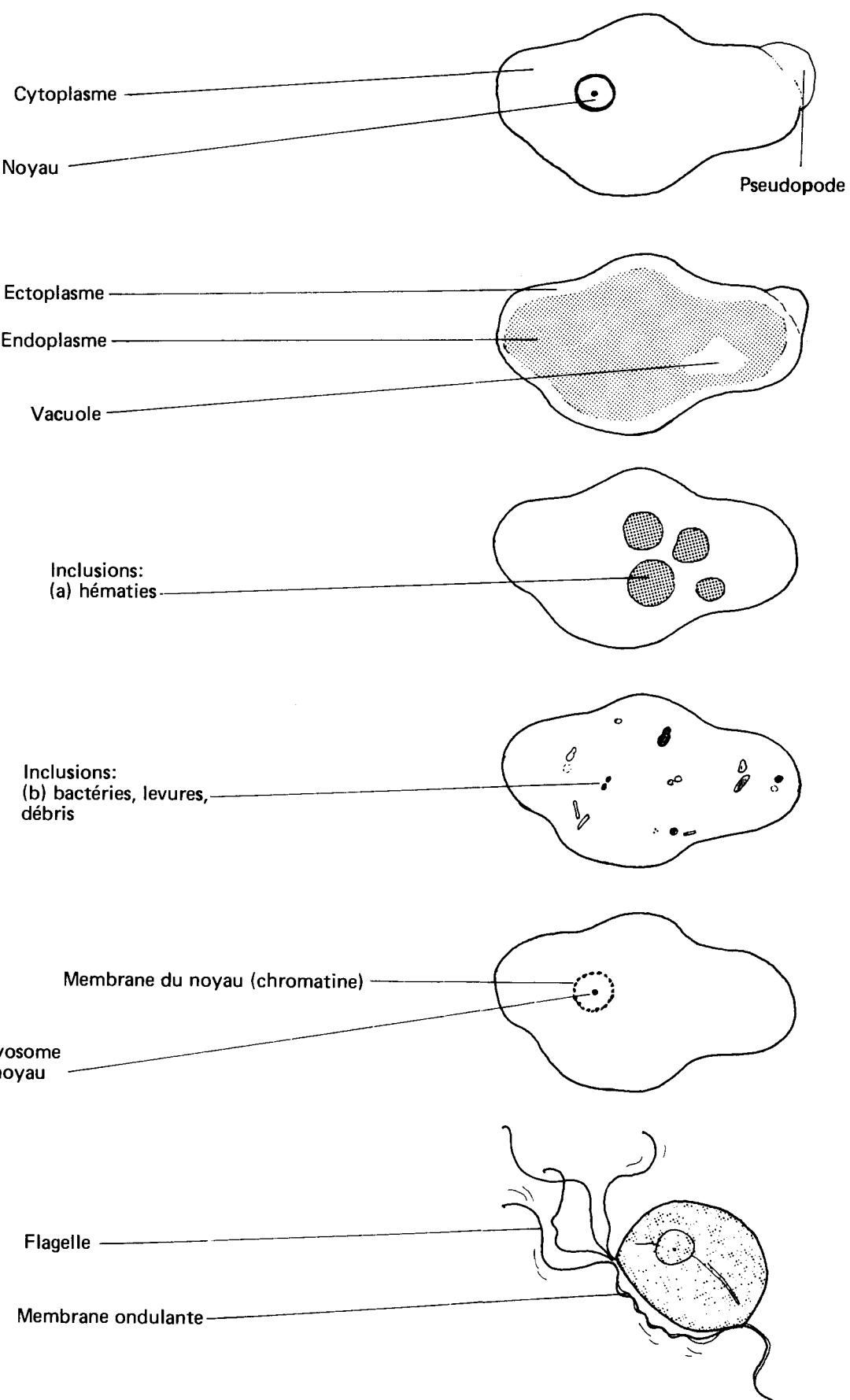
C. CILIÉS

- | | |
|----------------------------|------------|
| 1. <i>Balantidium coli</i> | Pathogène. |
|----------------------------|------------|

Le principal problème qui se pose au laboratoire est donc:

- de bien identifier: *E. histolytica*
G. lamblia
B. coli.

Quelques caractéristiques utiles pour reconnaître les formes mobiles des protozoaires intestinaux



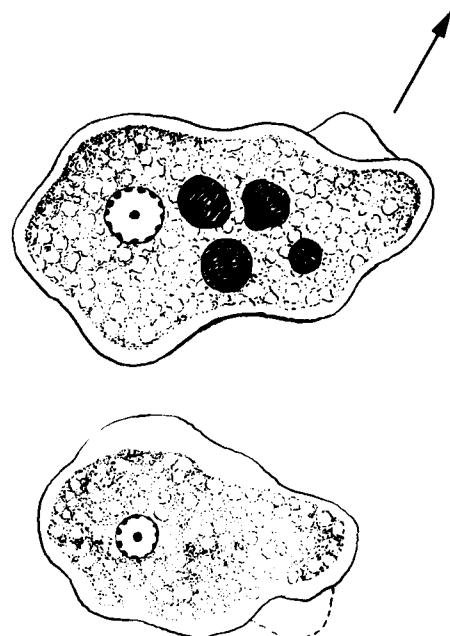
A. AMIBES

1. *Entamoeba histolytica* (amibe dysentérique)

Taille	variable, de 12 à 35 µm (correspond généralement à 3 ou 4 hématies)
Forme	allongée et déformée quand elle est en mouvement; arrondie quand elle est immobile
Mouvement	dans une seule direction; émet un pseudopode où elle se coule comme une limace, assez vite
Cytoplasme	Ectoplasme transparent, bien différencié de l'endoplasme finement granuleux (grisâtre à reflet jaune-vert) qui peut contenir des vacuoles
Noyau	invisible chez l'amibe mobile, mais sur l'amibe colorée au Lugol, on distingue nettement une membrane régulière et un caryosome central, petit, dense (comme un point noir).

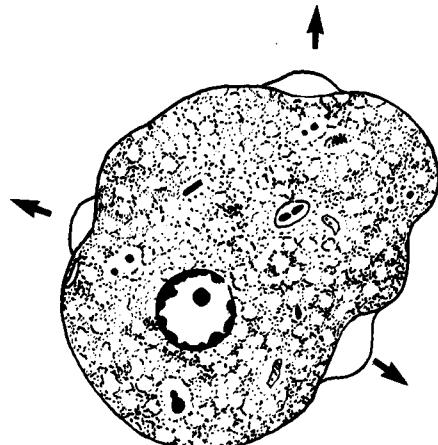
Deux formes mobiles de *E. histolytica* apparaissent dans les selles liquides ou diarrhéiques:

- (a) une *grande* espèce, mesurant 20 à 35 µm, avec vacuoles contenant des hématies plus ou moins digérées (1 à 20 de taille variable), ce qui indique une activité hématophage (consommation de sang) et, par conséquent, des propriétés pathogènes;
- (b) une *petite* espèce, non pathogène, prospérant dans la cavité intestinale, où elle mange des bactéries ou autres matières visibles à l'intérieur des vacuoles; mesure 12 à 20 µm.

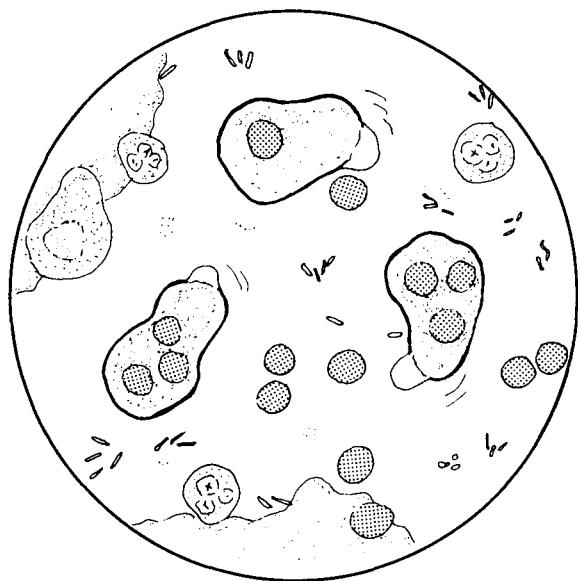


2. *Entamoeba coli*

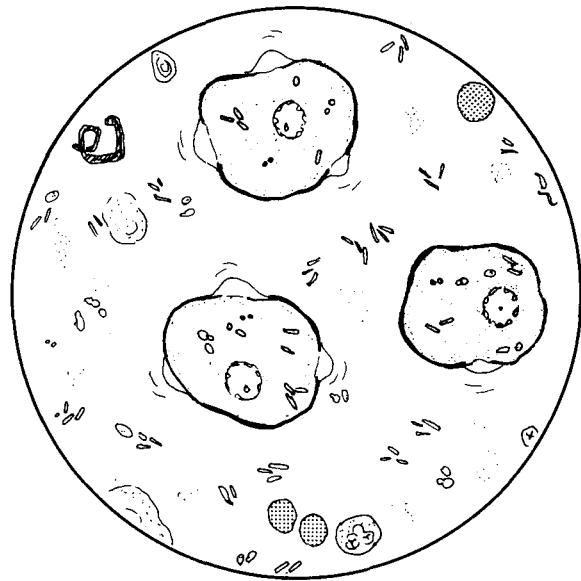
Taille	20 à 40 µm (généralement plus grosse que <i>E. histolytica</i>)
Forme	ovale ou allongée, assez irrégulière
Mouvement	souvent immobile ou se déplaçant très lentement, avec des pseudopodes courts, dans tous les sens, à l'aveuglette
Cytoplasme	Ectoplasme et endoplasme sont granuleux et difficiles à différencier
Inclusions	nombreuses et variées (bactéries, levures, débris divers), mais jamais d'hématies
Noyau	visible à l'état frais, sans coloration. La membrane est irrégulière, granuleuse (aspect de "collier de perles"), le caryosome gros et excentrique.



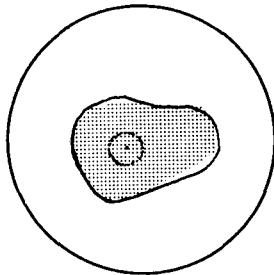
	Amibe dysentérique <i>Entamoeba histolytica</i>	Amibe du côlon <i>Entamoeba coli</i>
Déplacement	Dans une direction marquée	A l'aveuglette
Mouvement	Assez mobile	Peu ou pas mobile
Ectoplasme	Transparent, bien différencié de l'endoplasme	Peu ou pas différencié de l'endoplasme
Inclusions	Hématies si elle est hématophage	Bactéries, levures et débris divers, pas d'hématies
Noyau (à l'état frais)	Invisible	Visible (membrane nucléaire à aspect de collier de perles)
Noyau (après coloration au Lugol)	Membrane régulière Caryosome central, petit et dense	Membrane irrégulière Caryosome gros et excentrique



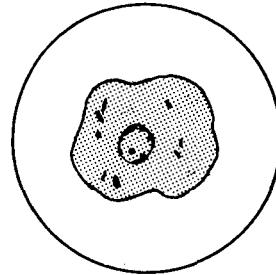
Entamoeba histolytica



Entamoeba coli



(après coloration au Lugol)

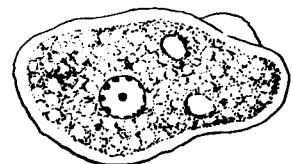


3. Autres amibes

Entamoeba hartmanni

Taille petite, toujours inférieure à 10 µm (environ la taille d'une hématie)

Possède les mêmes caractéristiques qu'*E. histolytica*, mais ne contient jamais d'hématie. Peut contenir des vacuoles assez nettes.



Endolimax nana

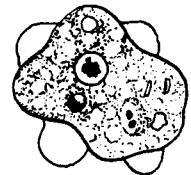
Taille petite, 6 à 10 µm

Mouvement nombreux pseudopodes, petits et ronds remuant lentement en tous sens

Cytoplasme bien granuleux, avec petites vacuoles

Inclusions variées (bactéries surtout)

Noyau (Lugol) caryosome en tache d'encre.



Iodamoeba butschli

Taille moyenne, 10 à 15 µm

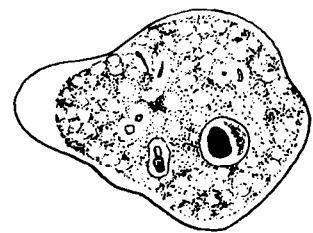
Forme ramassée, ressemble à une feuille d'arbre

Mouvement très lent; pseudopodes clairs en doigt ou en boule

Inclusions bactéries, grosses vacuoles

Noyau (Lugol) gros caryosome ovale, à côté d'un paquet de granulations.

Rares dans les selles.



Dientamoeba fragilis

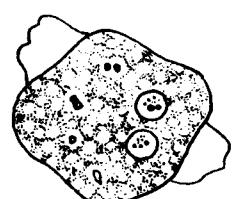
Taille petite et ronde, 6 à 15 µm

Mouvement soit immobile (le plus souvent), soit très mobile (dans les selles liquides très fraîches) avec des pseudopodes en ailes de ventilateur; s'immobilise très vite sous la lamelle

Cytoplasme ectoplasme clair

Inclusions bactéries

Noyau 1 ou 2 noyaux; (Lugol) caryosomes éclatés en 4 à 6 grains (membrane peu visible).

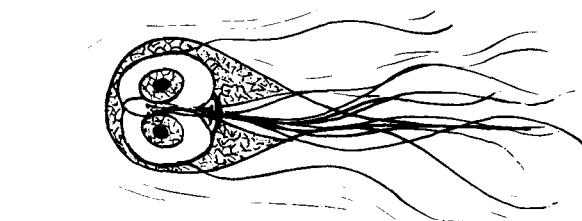


B. FLAGELLÉS

Tous ces parasites, à l'exception de *Trichomonas hominis*, peuvent se présenter sous leur forme végétative de flagellés actifs ou sous forme de kystes inactifs. Ces derniers sont décrits à la page 158.

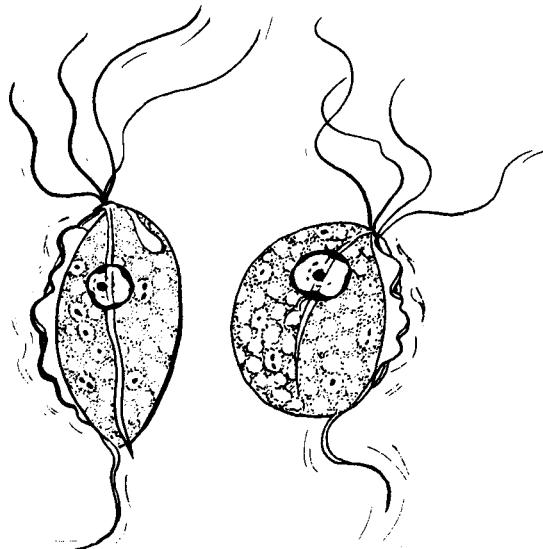
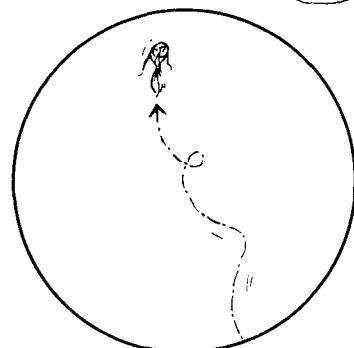
1. *Giardia lamblia* (le plus long flagellé)

<i>Taille</i>	10 à 18 µm (comme 2 hématies)
<i>Forme</i>	assez allongée: <i>de face</i> : en forme d'avocat, ou de poire <i>de profil</i> : en forme de cuillère
<i>Mouvement</i>	soit avance par petites secousses rapides dans une direction suivie, parfois en tournant (selles liquides), soit peu mobile
<i>Contenu</i>	2 gros noyaux ovales peu visibles.



Attention:

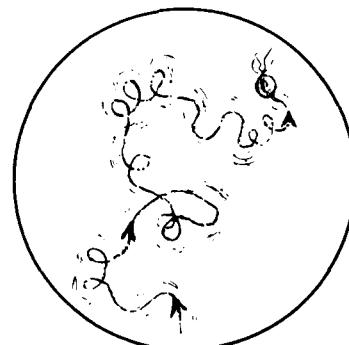
- le mouvement caractéristique ne s'observe que dans les selles liquides fraîches
- les parcelles de selles liquides contenant du mucus renferment souvent des amas de nombreuses *G. lamblia*
- dans les selles molles, on trouve souvent ensemble formes végétatives et kystes de *G. lamblia*.

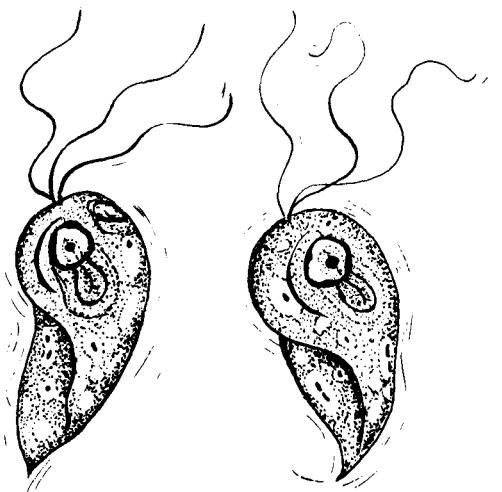


2. *Trichomonas hominis*

<i>Taille</i>	10 à 15 µm (un peu plus petit que <i>G. lamblia</i>)
<i>Forme</i>	ovale, avec 2 pôles pointus
<i>Mouvement</i>	tourbillonne et tourne dans tous les sens, semble vibrer
<i>Membrane ondulante</i>	d'un côté seulement, très mobile (sorte d'ondulation rapide)
<i>Noyau</i>	1 noyau difficile à voir
<i>Flagelles</i>	le plus souvent 4.

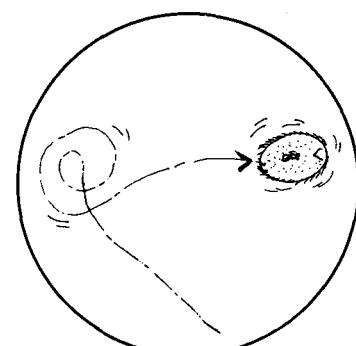
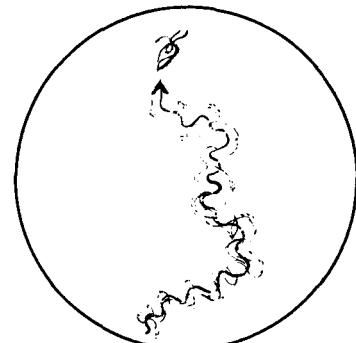
Trichomonas est le flagellé le plus résistant; il reste mobile même quand les selles ne sont plus fraîches.





3. *Chilomastix mesnili*

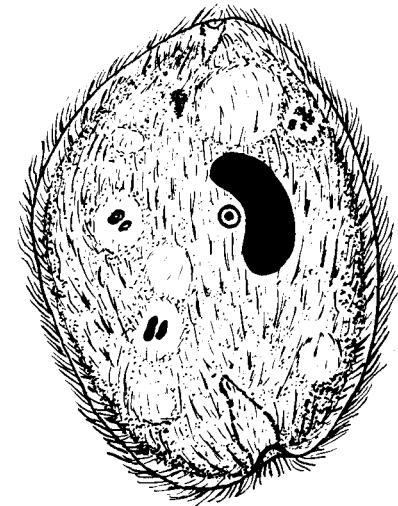
<i>Taille</i>	10 à 15 µm
<i>Forme</i>	triangulaire, avec une extrémité effilée, aspect tordu
<i>Mouvement</i>	se dirige dans une direction marquée, tout en tournant sur lui-même dans un mouve- ment de vrille
<i>Cytoplasme</i>	vert grisâtre avec:
	<ul style="list-style-type: none"> — <i>vers l'extrémité effilée</i>: une strie spirale bien nette, autour de laquelle tourne le flagellé (en 8) — <i>vers l'extrémité arrondie</i>: une sorte de bouche (le cytostome faiblement visible)
<i>Noyau</i>	un seul noyau, assez visible à frais.



C. CILIÉS

1. *Balantidium coli* (rare)

<i>Taille</i>	très grande — 50 µm (souvent aussi gros ou plus gros qu'un œuf d'Ascaris)
<i>Forme</i>	ovale, avec un pôle plus arrondi que l'autre; transparent
<i>Cils</i>	couvert de nombreux petits cils, agités d'un battement rapide
<i>Mouvement</i>	se déplace très rapidement dans les selles, traverse le champ en suivant une direction marquée, en tournant quelquefois en cercles
<i>Noyau</i>	un gros noyau en forme de haricot, à côté d'un très petit noyau rond
<i>"Bouche"</i>	le cytostome: c'est une sorte de bouche qui se contracte, s'agrandit et aspire les débris rencontrés.



Attention: Si des selles sont abandonnées à l'air, sans être couvertes, des protozoaires de type "infusoires" qui ressemblent assez à *Balantidium coli* peuvent y tomber.

7. Amibes, flagellés et ciliés : kystes

Les kystes sont les petites formes rondes, résistantes et immobiles, de certains protozoaires intestinaux (pour leur forme mobile voir page 147). Ils peuvent avoir un ou plusieurs noyaux.

Importance

(a) Importance clinique

Elle varie selon les régions du monde. L'essentiel est de découvrir et de reconnaître *les kystes d'Entamoeba histolytica, de Giardia lamblia et de Balantidium coli*, mais leur présence dans les selles a une signification immédiate moins grave que celle des formes végétatives. Même des sujets en bonne santé peuvent être porteurs de kystes.

(b) Importance pour la santé publique

Le kyste est la forme infectante. Les porteurs de kystes constituent donc un danger pour la santé publique. En outre, cette recherche peut avoir une utilité épidémiologique.

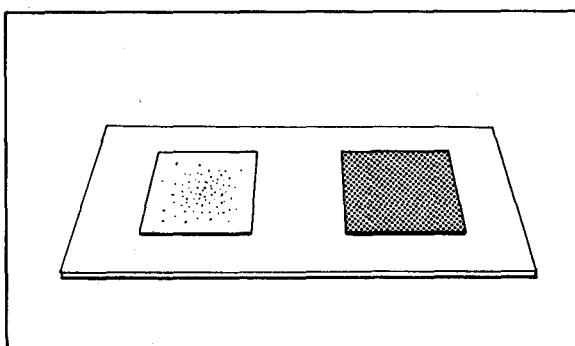
Selles contenant des kystes

Les kystes sont généralement trouvés aussi bien dans les selles molles que dans les selles dures.

Examen des lames

1. Préparation au soluté physiologique (réactif No. 47)

Les kystes y apparaissent comme des globules transparents, réfringents, bien nets par rapport au fond gris, avec une paroi bien dessinée.



2. Préparation au Lugol (réactif No. 38 dilué 5 fois)

Les noyaux se colorent. Examiner à l'objectif 40 x.

3. Pour compter les noyaux

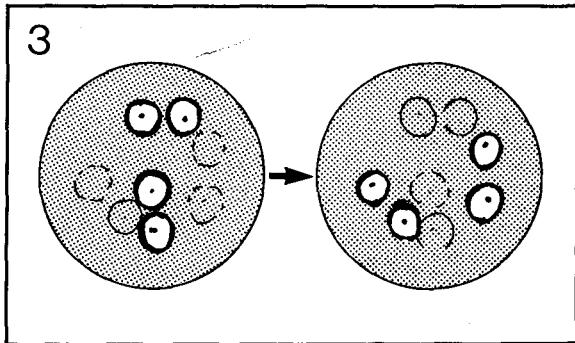
Faire varier la vis micrométrique.

4. Identification

Il ne suffit pas d'examiner un seul kyste; en observer plusieurs, successivement.

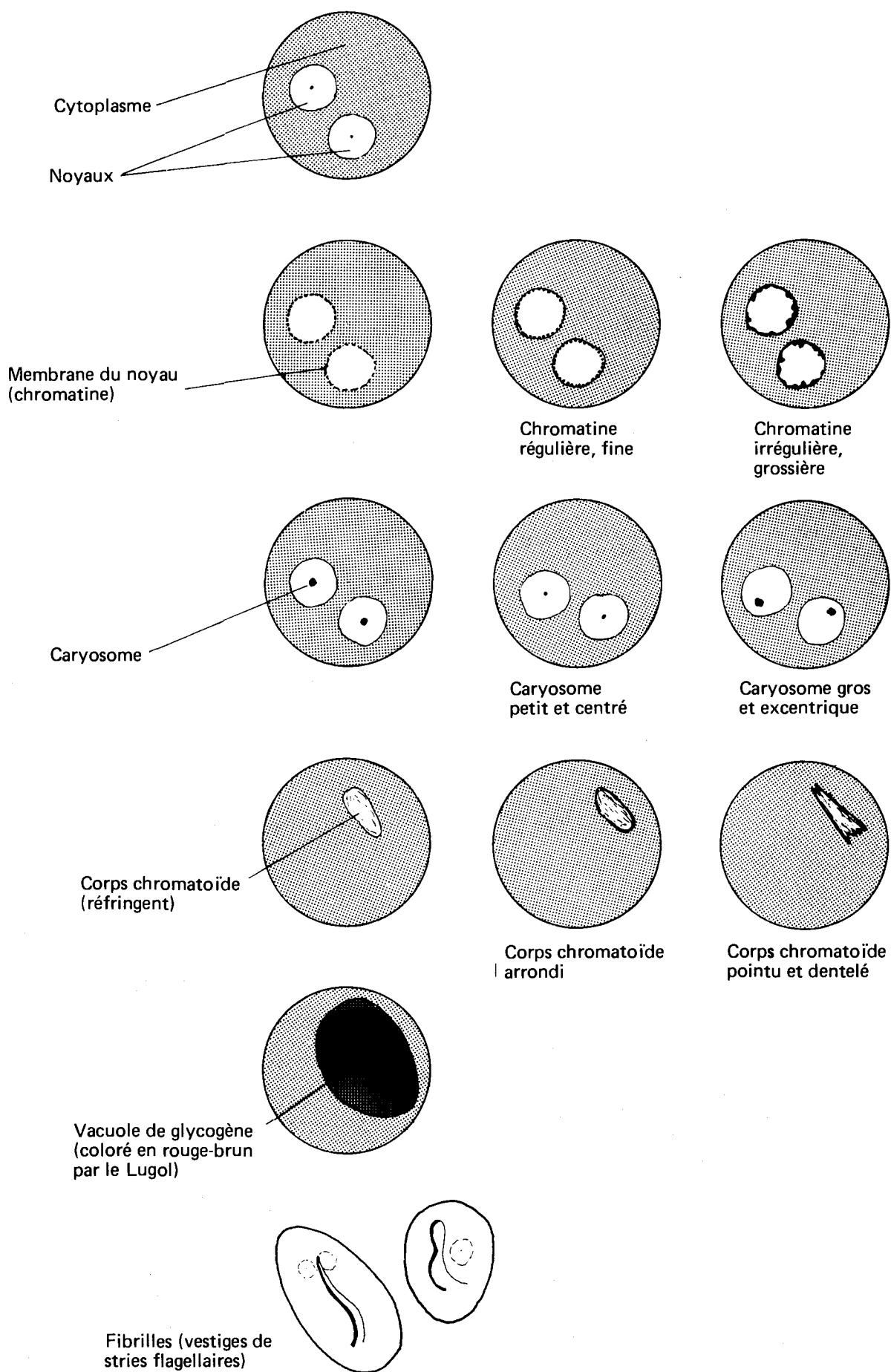
5. Concentration

Eventuellement, faire une concentration au formol-éther (voir page 165), afin de disposer d'un plus grand nombre de kystes pour mieux les identifier.



On peut trouver dans les mêmes selles des kystes de plusieurs espèces différentes.

Quelques caractéristiques utiles pour reconnaître les kystes de protozoaires intestinaux

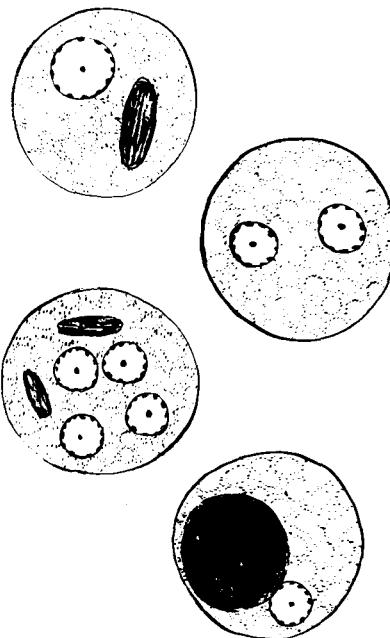


KYSTES D'AMIBES

Entamoeba histolytica

Cette amibe provoque la dysenterie.

Taille	12 à 15 μm (1½ à 2 hématies)
Forme	ronde
Noyaux	1 à 4 noyaux: <ul style="list-style-type: none"> — membrane fine, régulière, circulaire — caryosome petit, dense et central (comme un point noir)
Cytoplasme	(Lugol) jaune grisâtre, granuleux, aspect "sale"
Corps chromatoïdes	oblongs, à bouts arrondis (en forme de saucisse); ne se trouvent pas dans tous les kystes
Vacuole	parfois grosse vacuole de glycogène (colorée en brun-rouge par le Lugol) avec 1 ou 2 noyaux dans les kystes jeunes.

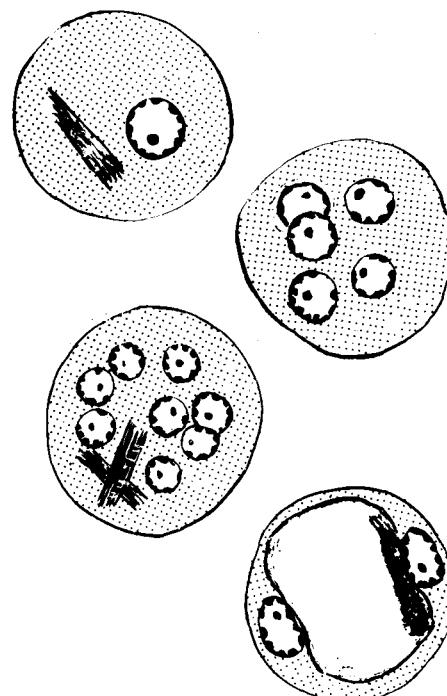


Kystes d'autres amibes ne provoquant pas de maladies

Identification délicate. L'essentiel est de les différencier des kystes d'*E. histolytica*.

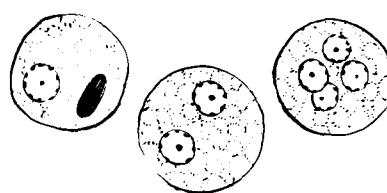
1. *Entamoeba coli*

Taille	12 à 20 μm (2 à 2½ hématies) un peu plus gros que le kyste d' <i>E. histolytica</i>
Forme	rond ou un peu ovale, parfois déformé
Noyaux	1 à 8 noyaux: <ul style="list-style-type: none"> — membrane irrégulière, épaisse par endroits, en cercle déformé — caryosome gros, peu dense, souvent excentrique
Cytoplasme	(Lugol) jaune clair, lumineux (par rapport aux kystes d' <i>E. histolytica</i>)
Corps chromatoïdes	bouts pointus ou dentelés (aspect de poignard ou d'aiguille); ne se trouvent pas dans tous les kystes
Vacuole	parfois très grosse vacuole (colorée en brun-rouge par le Lugol), écrasant 2 noyaux aux 2 pôles opposés.



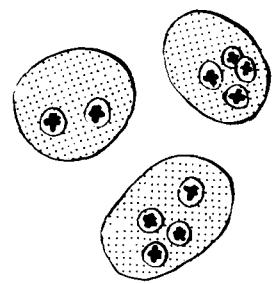
2. *Entamoeba hartmanni*

Taille	petit kyste de 4 à 8 μm (diamètre d'1/2 à 1 hématie)
Noyaux	1 à 4, identiques à ceux d' <i>E. histolytica</i> .



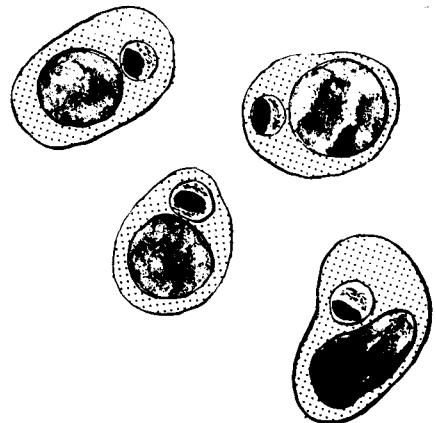
3. *Endolimax nana*

Taille	assez petit kyste de 8 à 10 µm
Forme	plus ou moins ovale
Noyaux	1 à 4 <ul style="list-style-type: none"> — <i>membrane</i>: invisible — <i>caryosome</i>: gros, aspect irrégulier
Cytoplasme	clair, sans granulations, coloré en jaune foncé par le Lugol.



4. *Iodamoeba butschli*

Taille	petit kyste de 8 à 10 µm
Forme	variable (rond, ovale ou irrégulier)
Noyau	presque toujours un seul noyau <ul style="list-style-type: none"> — <i>membrane</i>: invisible — <i>caryosome</i>: très gros, ovale, plaqué contre un bouquet de granulations
Vacuole	très grosse vacuole de glycogène (colorée en brun-rouge par l'iode contenu dans le Lugol: d'où son nom d' <i>iodamoeba</i>), occupe souvent la moitié du kyste.



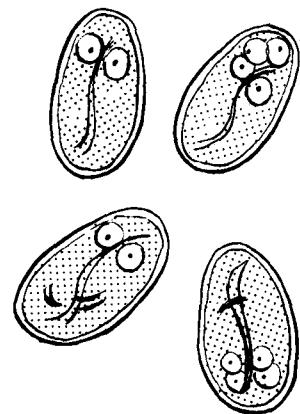
5. *Dientamoeba fragilis*

N'apparaît pas sous forme de kyste.

KYSTES DE FLAGELLÉS ET CILIÉS

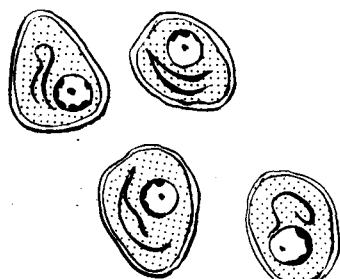
1. *Giardia lamblia*

Taille	8 à 12 µm
Forme	ovale, avec un pôle plus arrondi que l'autre
Coque	apparaît souvent comme une coque un peu épaisse à double paroi; en fait, la 2ème paroi est la membrane du cytoplasme
Noyaux	2 à 4 noyaux ovales: <ul style="list-style-type: none"> — <i>membrane</i>: très fine — <i>caryosome</i>: petit, central, peu coloré
Cytoplasme	clair, réfringent avant coloration, coloré en jaune-vert pâle ou bleuté par le Lugol
Fibrille	ligne réfringente, comme un cheveu, pliée en deux ou en forme de S, au milieu du kyste dans le sens de la longueur (faire varier la vis micrométrique).



2. *Chilomastix mesnili*

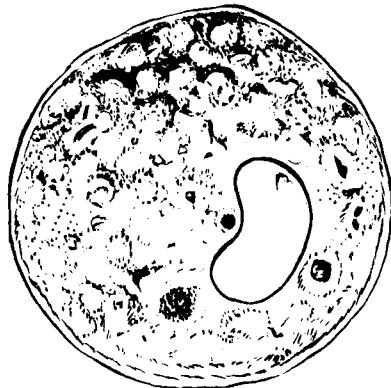
Taille	petit kyste de 6 à 8 µm
Forme	rond, avec un pôle plus étroit (en forme de poire)
Noyau	1 seul gros noyau <ul style="list-style-type: none"> — <i>membrane</i>: bien visible, épaisse par endroits — <i>caryosome</i>: petit et central
Fibrille	repliée, comme un cheveu bouclé.



3. *Balantidium coli*

Taille	très gros kyste, 50 à 70 µm (taille d'un œuf d'ascaris)
Forme	rond
Coque	double paroi mince
Noyaux	1 gros noyau en forme de haricot 1 petit noyau comme un point épaisse contre le gros noyau
Cytoplasme	granuleux, verdâtre, rempli d'inclusions variées

Souvent, on y distingue à peine un trophozoïte de *Balantidium* cilié, organisé et faiblement mobile.



Conclusion

Il est surtout important de pouvoir identifier:

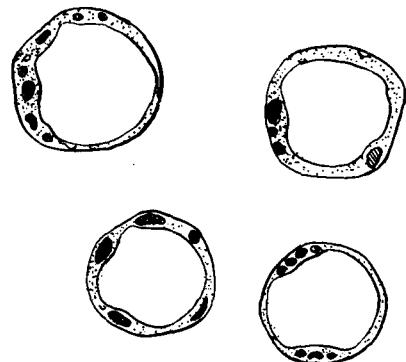
- les kystes d'*ENTAMOEBA HISTOLYTICA*
- les kystes de *GIARDIA LAMBLIA*
- et les kystes de *BALANTIDIUM COLI*.

FORMES À NE PAS PRENDRE POUR DES KYSTES

1. Blastocystis

<i>Taille</i>	variable entre 5 à 20 μm (10 μm en moyenne)
<i>Forme</i>	rond ou ovale, avec parfois des bords anguleux, déformés
<i>Contenu</i>	1 grosse vacuole qui remplit presque toute la cellule; le cytoplasme comprimé forme tout autour un anneau granuleux
<i>Couleur</i>	très réfringent avant coloration; le Lugol ne colore pas la vacuole, mais le pourtour est jaune clair.

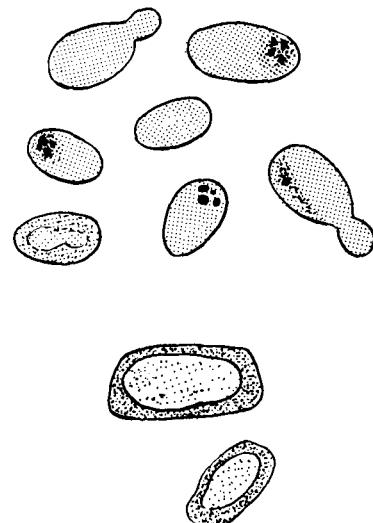
Certains médecins demandent qu'on leur signale la présence de *Blastocystis* notamment dans les selles d'enfants.



2. Levures

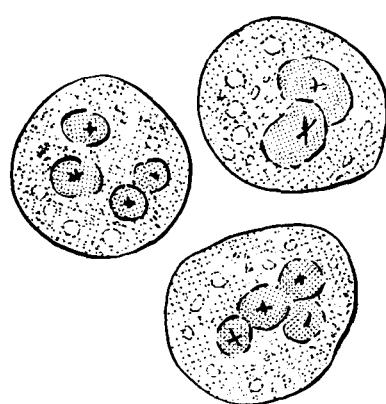
<i>Taille</i>	petite (5 à 8 μm)
<i>Forme</i>	ovale et portant souvent des bourgeons
<i>Contenu</i>	souvent un amas excentrique de 3 à 6 petites granulations
<i>Couleur</i>	brun-rouge (Lugol).

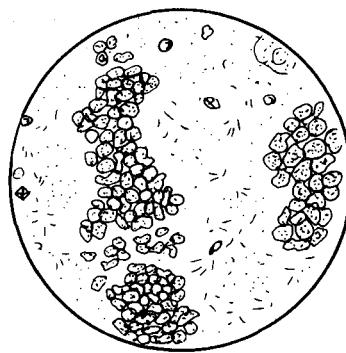
Certaines formes voisines sont rectangulaires, avec un cytoplasme interne ovale, très clair: arthrospores.



3. Leucocytes

<i>Taille</i>	10 à 20 μm
<i>Forme</i>	ronde ou un peu allongée, avec des contours irréguliers
<i>Contenu</i>	cytoplasme réfringent, clair et granuleux, avec de toutes petites vacuoles
<i>Noyau</i>	flou, avec parfois un "faux caryosome" en forme d'étoile.





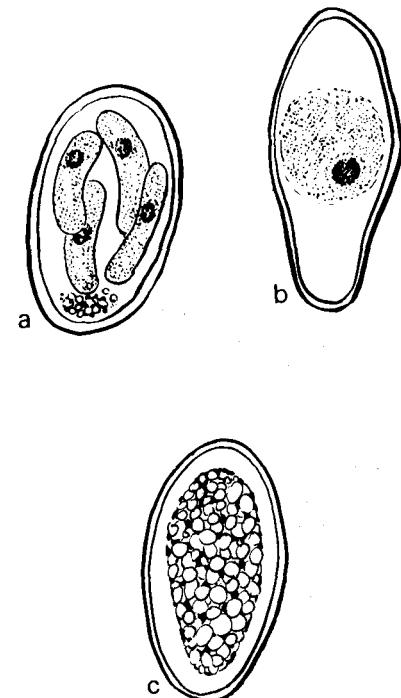
4. Pus

Le pus se voit à l'œil nu, en traînées grisâtres mates (il n'est pas transparent comme le mucus). Au microscope il apparaît comme un amas de leucocytes plus ou moins détruits (signaler sa présence dans le résultat).

5. Coccidies

Ce sont des protozoaires qui peuvent parasiter l'homme (sans effet pathogène important) ou qui peuvent être trouvés en transit dans les selles après consommation d'aliments infectés (poisson, lapin, etc.). Dans les selles, ils se présentent sous une forme proche des kystes (ils sont appelés oocystes ou sporocystes).

<i>Taille</i>	15 à 20 µm, selon l'espèce
<i>Forme</i>	ovale allongé, parfois rétréci à 1 pôle
<i>Couleur</i>	incolore, transparent (ou quelquefois jaune clair)
<i>Coque</i>	bien nette, à double ligne, un peu réfringente; avec quelquefois une sorte d'opercule à un pôle
<i>Contenu</i>	3 types (a) 4 sporozoïtes (petits bâtonnets en forme de banane, chacun contenant un petit noyau rond; il y a aussi parfois quelques grosses granulations rassemblées à un pôle) (b) 1 grande cellule ronde granuleuse (c) contenu complètement rempli de granulations réfringentes.



8. Choix d'une méthode de concentration parasitaire

Intérêt des concentrations

Les concentrations parasitaires, appelées aussi "enrichissement" permettent:

- d'examiner une plus grande quantité de selles sous un petit volume
 - de trouver les parasites, même s'ils sont peu nombreux.
-

Attention:

Il faut toujours procéder à *un examen microscopique direct* des selles avant de faire une concentration. (Les formes mobiles des protozoaires disparaissent dans les préparations concentrées.)

TECHNIQUES

On proposera ci-dessous trois techniques différentes:

1. Technique de Willis (solution saline)
2. Technique au formol-éther ou MIF
3. Technique spéciale de Harada-Mori pour larves d'anguillule.

Le choix de la technique appropriée est fonction des éléments suivants:

- (a) matériel disponible
 - (b) parasites recherchés
 - (c) temps disponible
 - (d) autres considérations (telles que le rapport coût/efficacité des enquêtes entreprises).
-

9. Concentration parasitaire à l'aide d'une solution saline (Willis)

Méthode recommandée pour:

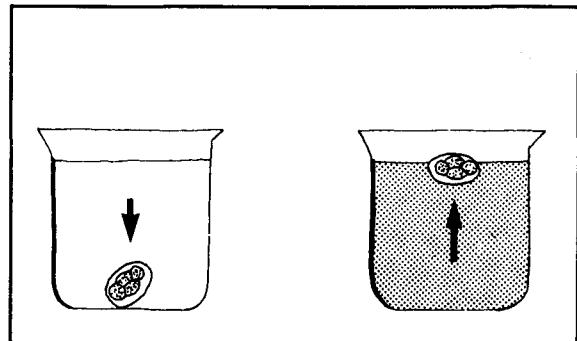
Oeufs d'ankylostomes, d'ascaris, d'*H. nana*, de *Taenia*, de trichocéphale (méthode de choix pour le dépistage de l'ankylostome).

Ne convient pas pour:

Oeufs de douve et de schistosome, larves d'anguillule, protozoaires.

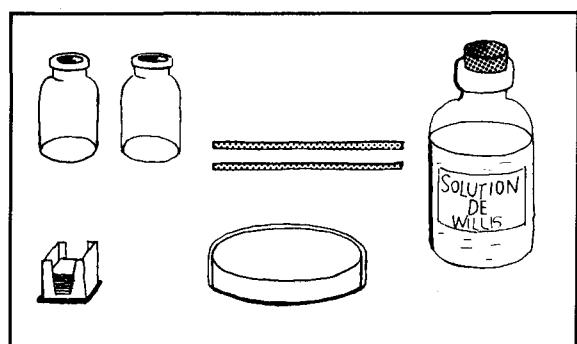
Principe

Les selles sont mélangées à une solution saturée en chlorure de sodium, ce qui en augmente la densité. Les œufs de parasites, plus légers, flottent et montent à la surface, où ils peuvent être prélevés.



MATÉRIEL

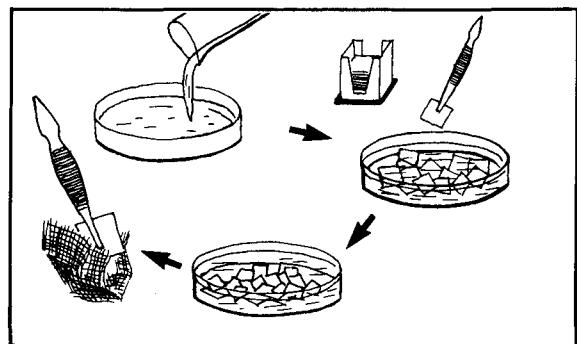
- Flacons de 10 ml (pénicilline)
- Applicateurs en bois
- Lamelles de verre
- Alcool
- Ether
- Boîte de Pétri
- Solution de Willis (réactif No. 58).



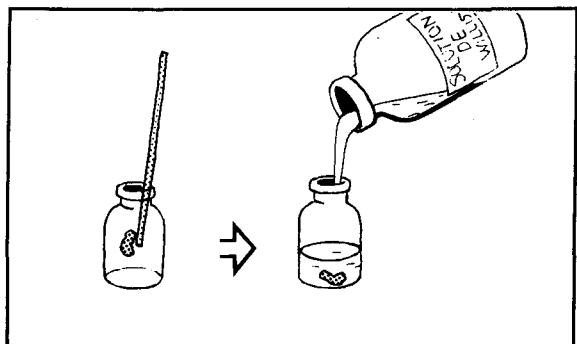
MÉTHODE

Préparation de lamelles dégraissées

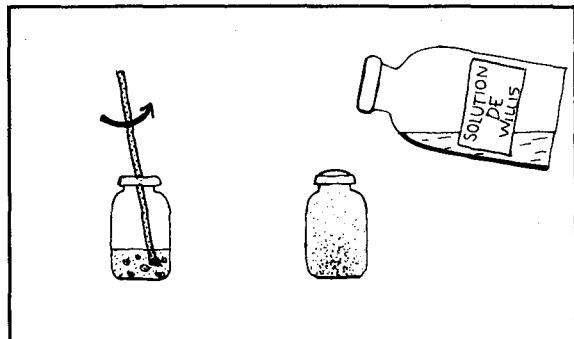
- (a) Mélanger dans une éprouvette:
 - 10 ml d'alcool à 95° et 10 ml d'éther
- (b) Verser dans une boîte de Pétri et y placer une à une 30 lamelles; agiter et attendre 10 minutes
- (c) Sortir les lamelles une à une et les essuyer à la gaze
- (d) Les conserver dans une boîte de Pétri sèche.



1. Dans un flacon de pénicilline, placer un morceau de selles d'environ 2 ml (2 cm^3). Remplir le quart du flacon avec de la solution de Willis.



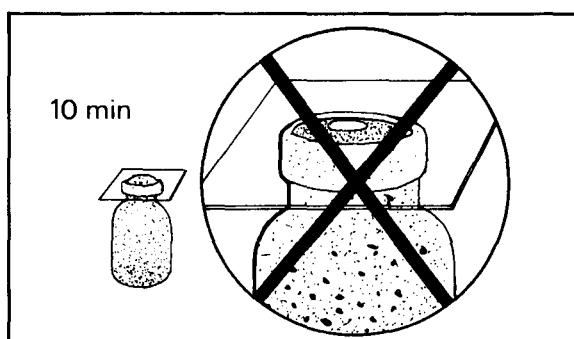
2. A l'aide d'un applicateur, écraser le morceau de selles et bien le mélanger à la solution. Puis, remplir complètement le flacon avec de la solution de Willis. La suspension doit être parfaitement homogène.



3. Déposer soigneusement une lamelle sur l'orifice du flacon.

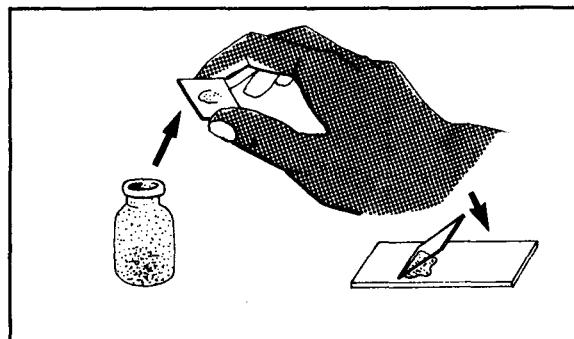


4. Vérifier que la lamelle recouvre complètement le liquide, sans bulle d'air. Laisser reposer 10 minutes.

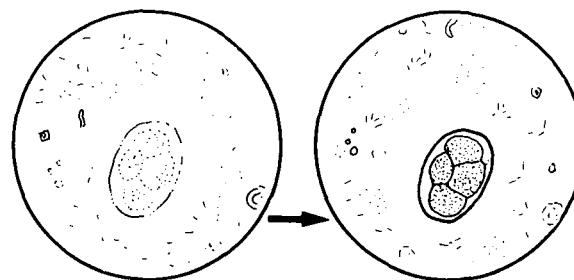


5. Retirer avec précaution la lamelle à laquelle doit adhérer une goutte du liquide.

Déposer la lamelle sur une lame et l'examiner immédiatement au microscope, car la préparation se dessèche très vite. Sinon, sceller la lamelle à la vaseline-bougie.



Faire varier la vis micrométrique pour chaque objet vu dans le champ microscopique (car les œufs ont tendance à coller à la lamelle et ne sont pas nets immédiatement).



10. Concentration parasitaire au formol-éther ou MIF

Méthode recommandée pour:

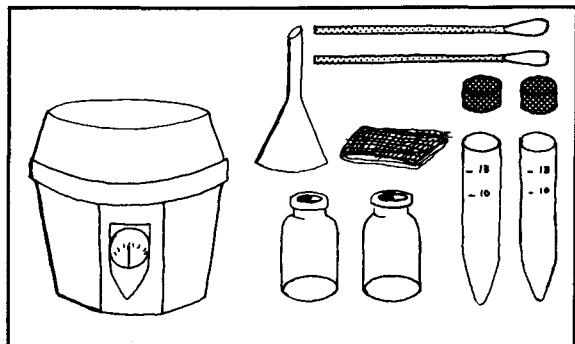
Tous les œufs et larves, et surtout pour les *kystes de protozoaires*.

Ne convient pas pour:

Les formes mobiles d'amibes et de flagellés.

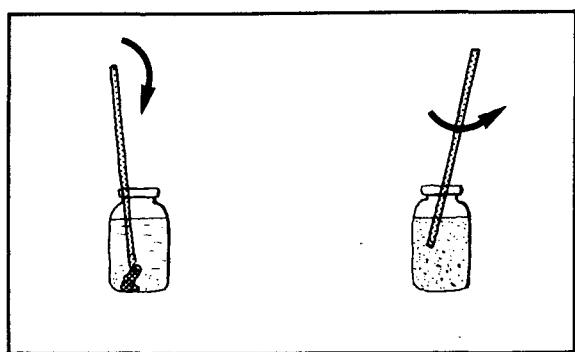
MATÉRIEL

- Centrifugeur électrique
- Tubes coniques à centrifuger de 15 ml, avec bouchons
- Flacons pénicilline
- Entonnoir
- Gaze
- Eprouvette graduée
- Ecouvillon-coton



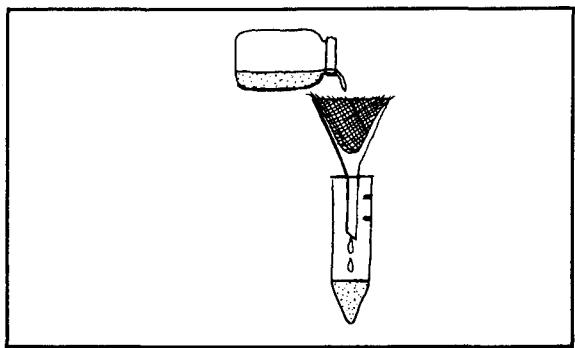
RÉACTIFS

Formol à 10% (réactif No. 26)
Ether pur (ou à défaut essence ordinaire)
Soluté physiologique (réactif No. 47)
MIF (réactif No. 41), si possible.

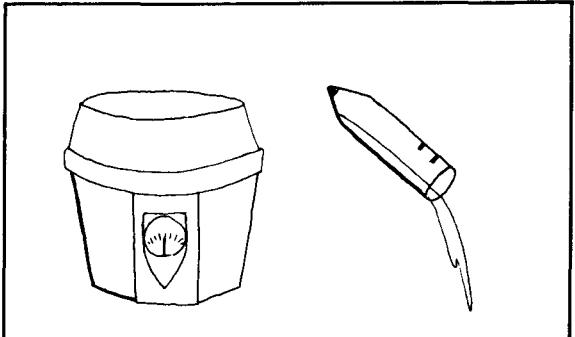


MÉTHODE AU FORMOL-ÉTHER

1. Prendre un morceau de selles d'environ 2 ml (2 cm^3). L'écraser et le mélanger à 10 ml (10 cm^3) de soluté physiologique.

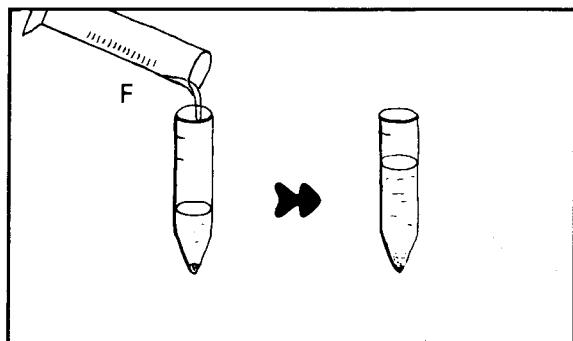


2. Filtrer à travers 2 couches de gaze dans un tube à centrifuger portant des graduations de 10 ml et de 13 ml.

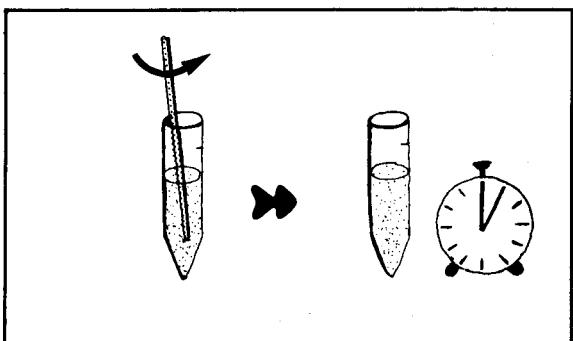


3. Centrifuger 1 minute à vitesse moyenne. Rejeter le surnageant. Si celui-ci est trouble, laver le culot une 2ème fois. Pour cela, le mélanger à 10 ml de soluté physiologique. Centrifuger 1 minute à vitesse moyenne et rejeter le surnageant.

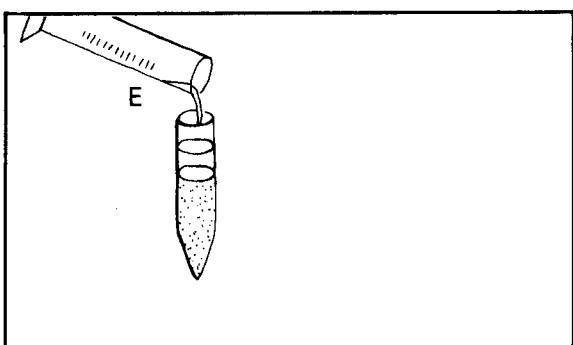
4. Ajouter au culot 10 ml de formol à 10% (réactif No. 26) (jusqu'à la graduation 10 ml).



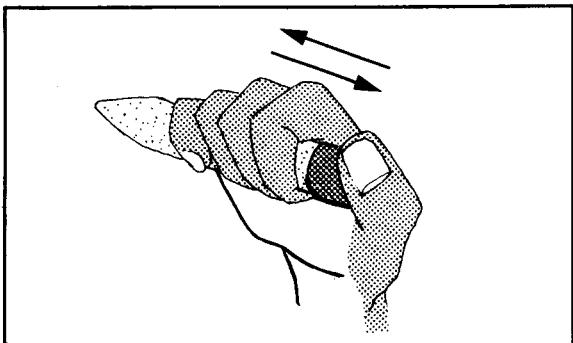
5. Bien délayer le culot et laisser reposer 5 minutes.



6. Ajouter 3 ml d'éther ou d'essence (jusqu'à la graduation 13 ml).
Attention: s'assurer qu'aucune flamme n'est allumée dans le laboratoire.



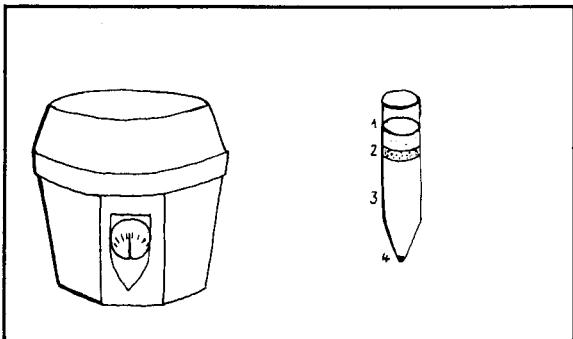
7. Boucher le tube. Le retourner sur le côté et l'agiter vivement pendant 30 secondes.



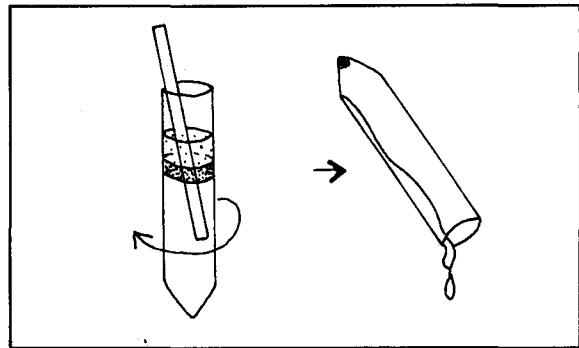
8. Déboucher avec précaution. Centrifuger 1 minute à vitesse réduite.

Le tube contiendra 4 couches:

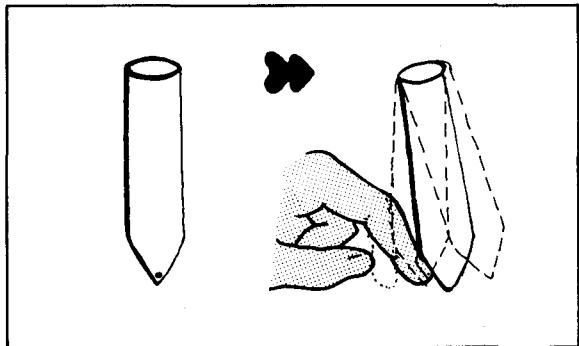
- 1ère couche: éther
- 2ème couche: débris
- 3ème couche: formol
- 4ème couche: le culot, qui contient les œufs et les kystes de parasites.



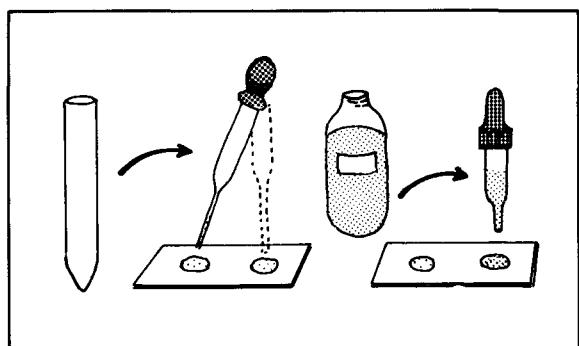
9. Décoller la 2ème couche du bout d'un applicateur en bois, en glissant celui-ci entre la couche et les parois du tube. Renverser le tube et rejeter tout le surnageant. A l'aide d'un écouvillon-coton, râcler tous les débris adhérant encore à l'intérieur du tube.



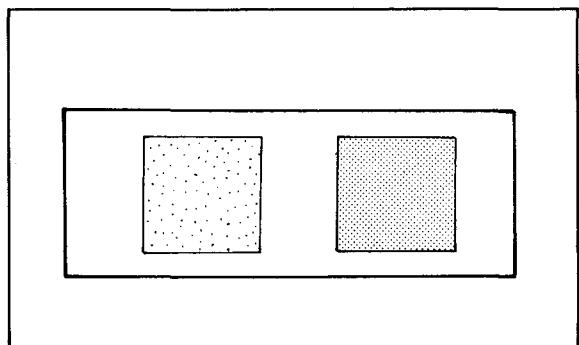
10. Bien mélanger le culot restant en tapotant doucement le fond du tube.



11. Déposer sur une lame 2 gouttes de culot. Ajouter 1 petite goutte de Lugol, uniquement à la 2ème goutte de culot.



12. Couvrir les 2 gouttes avec une lamelle.
Examiner au microscope.
Préparation 1 (non colorée): utiliser des objectifs 10 x et 40 x (œufs, larves?).
Préparation 2 (colorée): utiliser un objectif 40 x (kystes?).



Echantillons de selles reçues dans du formol:

Suivre la même méthode, mais en remplaçant le soluté physiologique (point 1) par de l'eau distillée.

MÉTHODE AU MIF

Procéder de la même manière qu'avec le formol-éther, mais remplacer les 10 ml de formol à 10% par 10 ml de solution MIF, continuer en ajoutant 3 ml d'éther, etc.

Cette méthode est excellente pour préserver les formes végétatives d'amibes, mais le réactif est coûteux.

11. Méthode de concentration pour larves d'anguillules (Harada-Mori)

Principe

Les larves d'anguillules des selles remontent le courant d'eau capillaire absorbée par un morceau de papier partiellement immergé dans un tube à essai et s'accumulent au fond du tube.

MATÉRIEL

- Tubes à essai (20 x 200 mm)
 - Bandes de papier filtre (30 x 150 mm)
 - Spatule.
-

MÉTHODE

- (a) A l'aide de la spatule, étaler une petite quantité d'échantillon de selles sur une bande de papier filtre (préalablement plié dans le sens de la longueur pour le maintenir rigide), mais en laissant libres 4 à 5 cm qui tremperont dans l'eau.
- (b) Placer le papier, la partie libre en bas, dans un tube à essai contenant 2,5 à 3 cm d'eau bouillie ou filtrée, sans que le papier touche le fond du tube.
- (c) Incrire à l'encre indélébile le numéro ou le nom du malade sur le tube.
- (d) Conserver le tube bouché avec un tampon de coton, ou, mieux, scellé au papier cellophane, pendant 7 à 8 jours à la température du laboratoire.
- (e) Rechercher les larves au fond du tube et les examiner après coloration au Lugol pour différencier les anguillules des larves d'ankylostomes (voir page suivante).

Note: Les larves d'anguillule peuvent, dans ces conditions, atteindre un stade infectieux (produisant des larves filariformes) ou devenir des vers adultes.

Note: Méthode de type Baerman: remplir un verre à pied d'eau tiède (45° C) et mettre en contact avec l'eau 20-30 grammes de selles déposées sur un mouchoir en papier dans un tamis ou une passoire. Après au moins deux heures de contact entre l'eau et les selles, siphoner l'eau en prenant bien soin de ne pas l'agiter et de laisser au fond quelques centimètres cubes. C'est dans ce culot que les larves seront recherchées entre lame et lamelle à l'objectif 10x.

LARVES DÉCOUVERTES DANS LES SELLES

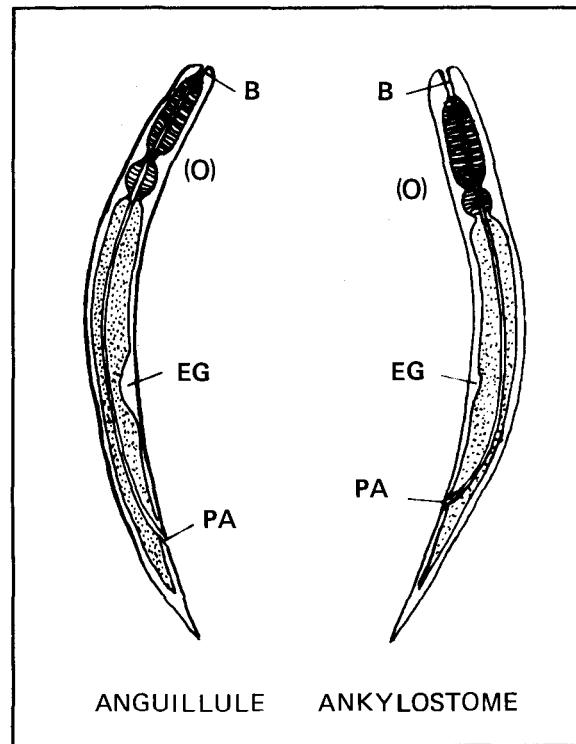
Ce sont le plus souvent des larves d'anguillule ou, parfois, d'ankylostome:

- Larves d'anguillule: aussi bien dans les selles fraîches que vieilles.
- Larves d'ankylostome: uniquement dans les selles obtenues 24 à 48 heures auparavant.

On peut les différencier à l'examen microscopique, après coloration au Lugol.

LARVES	ANGUILLE	ANKYLOSTOME
longueur	200-300 µm	200-300 µm
largeur	15 µm	15 µm
œsophage (O)	avec deux renflements*	avec deux renflements*
bouche (B)	courte: 4 µm (½ hématie)	longue: 15 µm (2 hématies)
extrémité postérieure	légèrement effilée	très effilée
ébauche génitale (E.G.)	grande et nette (22 µm)	petite (7 µm)
pore anal (P.A.)	situé à 50 µm de l'extrémité postérieure	situé à 80 µm de l'extrémité postérieure

* Les larves à 2 renflements œsophagiens sont appelées *rhabditoides*.



12. Comment consigner les résultats des examens de selles

Exemple:

M. Amala — Examen de selles — 8.5.79

Un résultat d'examen de selles doit contenir les précisions suivantes:

1. Consistance des selles
2. Présence d'éléments anormaux, visibles à l'œil nu
3. Présence de parasites découverts à l'examen microscopique; préciser:
 - l'espèce
 - le stade de développement
 - la quantité

Selles molles, non moulées
Présence de mucus
Présence de:
Giardia lamblia
Formes végétatives
Nombreuses

1. CONSISTANCE DES SELLES

Elles peuvent être:

- dures et sèches
- fermes et moulées
- molles et moulées
- molles et non moulées
- semi-liquides (en bouse)
- liquides et aqueuses.

2. PRÉSENCE D'ÉLÉMENTS ANORMAUX

On peut observer à l'œil nu les éléments suivants:

- mucus (matière incolore, gluante, ressemblant à du crachat)
- membranes muqueuses
- mucus sanguinolent
- traces de pus
- sang superposé aux selles, qui sont colorées en rouge par endroits.

3. PARASITES

Espèce œufs de ver: donner le nom courant en français (suivi du nom scientifique latin pour les schistosomes, les douves et les ténias).
protozoaires: donner le nom scientifique latin.

Nom scientifique 1er nom (genre): l'écrire avec une majuscule, par exemple *Schistosoma*.
2ème nom (espèce): l'écrire avec une minuscule, par exemple *mansi*.

Stade de développement œufs, larves, formes végétatives, segments de ver, etc. Dans le cas d'*E. histolytica*, bien préciser si elle contient ou non des hématoïdes digérées.

Quantité rares (1 à 2 œufs par lames); quelques-uns (3 à 5); assez nombreux (6 à 12); nombreux (plus de 12).

Si on n'a pas trouvé de parasites, indiquer "Recherche de parasites négative" en précisant "à l'examen direct" ou "après concentration" (spécifier la méthode). Ne jamais employer l'expression catégorique: "Aucun parasite".

EXEMPLES DE RÉSULTATS D'EXAMENS DE SELLES

- M. A* Selles dures et sèches.
Quelques œufs de *Trichuris trichiura* découverts à l'examen direct.
- M. B* Selles liquides, présence de mucus sanguinolent.
Assez nombreuses formes végétatives d'*E. histolytica*, quelques œufs d'ankylostome.
- M. C* Selles fermes, moulées.
Examen direct: recherche de parasites et d'œufs négative.
- Mme D* Selles molles, non moulées.
Recherche de parasite négative à l'examen direct et après concentration (méthode au formol-éther).
- M. E* Selles semi-liquides, en bouse.
Examen direct: rares larves d'anguillule découvertes.
- M. F* Selles molles et moulées, avec traces de sang.
Présence de quelques œufs de schistosomes (*S. mansoni*).
- Mme G* Selles fermes et moulées.
Présence de quelques anneaux de *Taenia saginata*.
- M. H* Echantillon de selles reçu en très petite quantité et desséché.
Examen direct: recherche d'œufs et de parasites négative.
L'état de l'échantillon n'a pas permis de rechercher les formes végétatives des protozoaires.
-

MODÈLE DE FICHE DE RÉSULTAT D'EXAMEN DE SELLES

Le technicien coche la mention qui convient et remplit les cases.

Dans certains pays, la fiche comporte une liste des principaux parasites rencontrés.

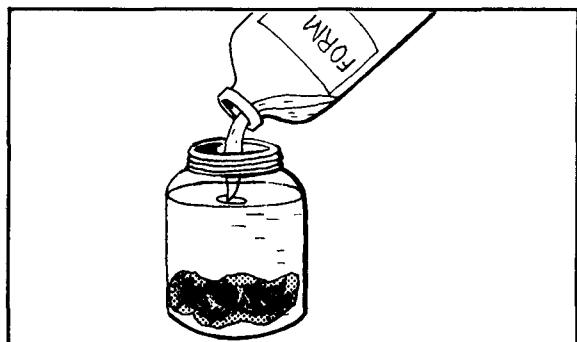
Présence de parasites	Le technicien coche la case concernée avec:
Oeufs d' <i>Ankylostome</i>	+ (quelques œufs)
Oeufs d' <i>Ascaris</i>	++ (assez nombreux)
Oeufs d' <i>H. nana</i>	+++ (très nombreux)
Oeufs de <i>S. mansoni</i>	<i>E. histolytica</i> (f.v.) (avec/sans hématies ingérées)
Oeufs de <i>Trichocéphale</i>	<i>E. histolytica</i> (kyste)

13. Expédition de selles pour recherche de parasites

Des échantillons de selles peuvent être expédiés à un laboratoire spécialisé pour identification de parasites rares, difficiles à reconnaître.

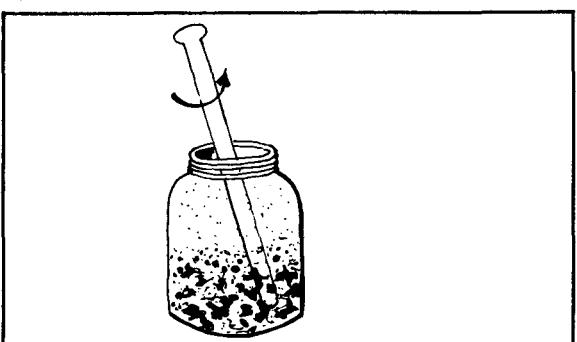
Conserveurs utilisés:

1. Formol à 10% (réactif No. 26) pour examen à l'état frais
2. MIF (réactif No. 41) pour examen à l'état frais
3. PVA (alcool polyvinyle) pour coloration permanente.



1. AVEC LE FORMOL À 10%

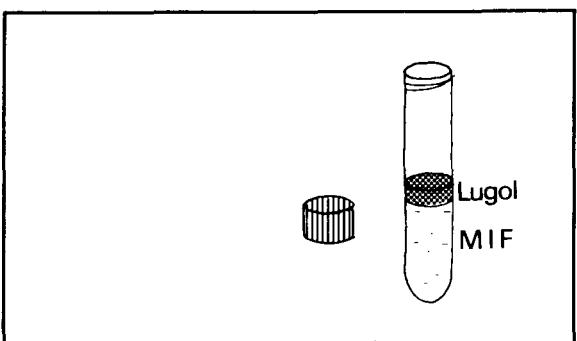
Mélanger 1 partie de selles pour 3 parties de formol.



Bien écraser les selles à l'aide d'un agitateur.

Conserve œufs et kystes de parasites.
Ne conserve pas les formes végétatives des protozoaires qui sont détruites après quelques jours.

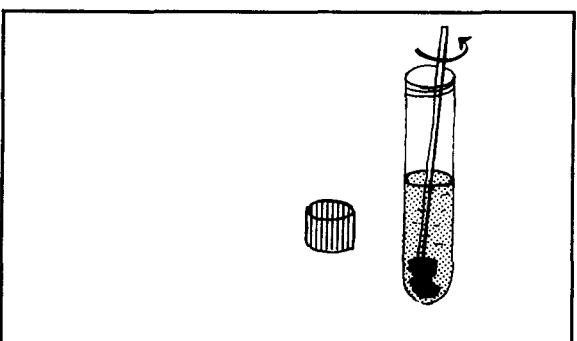
Durée de conservation *indéfinie* si le flacon est bien bouché.



2. AVEC LE MIF

Juste avant d'expédier l'échantillon, mélanger dans un tube ou un petit flacon:

- 4,7 ml de solution MIF
- 0,3 ml de solution de Lugol (réactif No. 38).



Y ajouter un morceau de selles d'environ 2 ml (2 cm^3).

Bien écraser avec un agitateur.

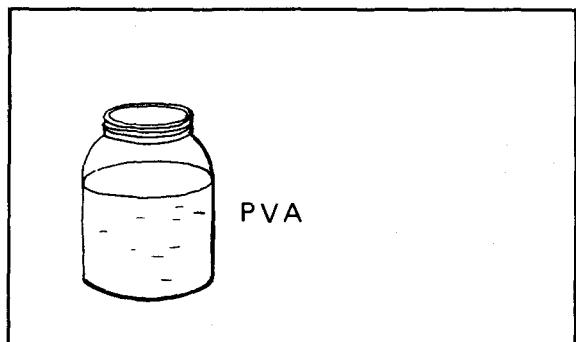
Conserve toutes les formes de parasites, même les formes végétatives des amibes (celles des flagellés sont un peu détériorées).

Durée de conservation *indéfinie*.

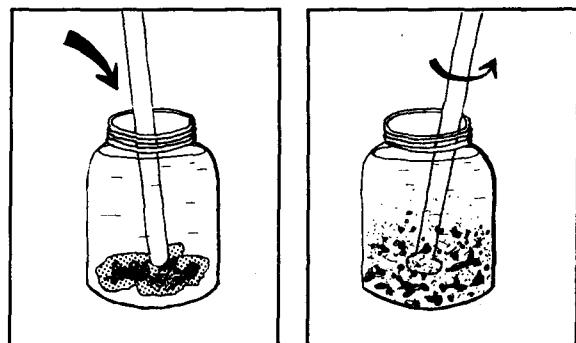
3. AVEC LE PVA

(a) Dans un flacon

1. Verser environ 30 ml de fixateur PVA dans le flacon, qui doit être rempli aux trois quarts.

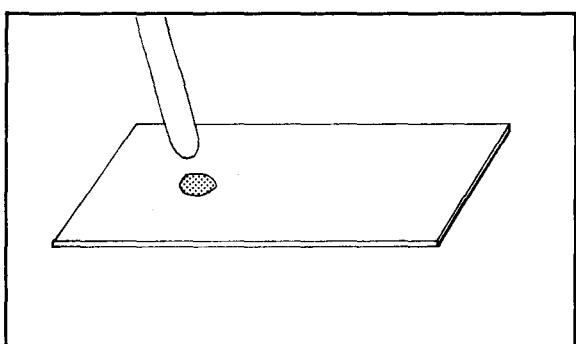


2. Placer un morceau de selles *fraîches* d'un volume correspondant au dernier 1/4 du flacon, de manière à ce que celui-ci soit désormais complètement rempli.
3. Ecraser à fond avec un agitateur.
Conserve indéfiniment toutes les formes de parasites.

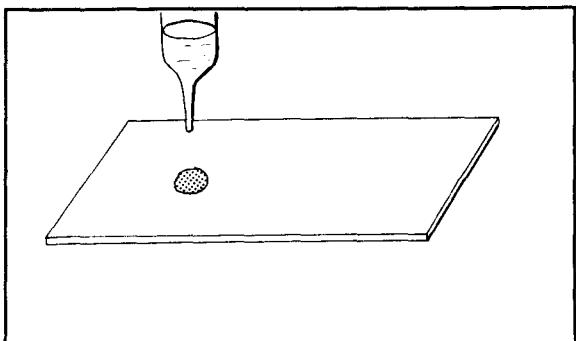


(b) Sur une lame

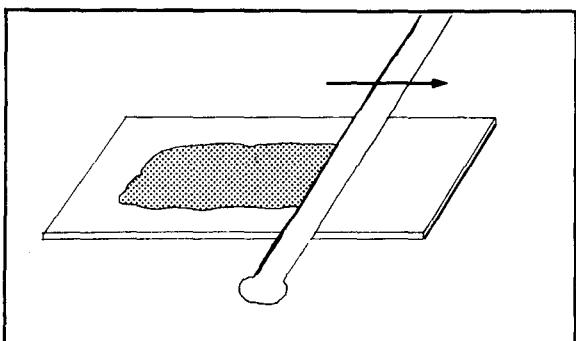
1. Pour la recherche des amibes et flagellés, placer 1 petite parcelle de selles à une extrémité de la lame.



2. Ajouter à l'échantillon:
– 3 gouttes de PVA.



3. Etaler doucement avec un agitateur sur la moitié environ de la lame.
Laisser sécher 12 heures (de préférence à 37°C).
Les lames se conservent 3 mois environ.
Elles peuvent être colorées dès leur arrivée au laboratoire spécialisé.



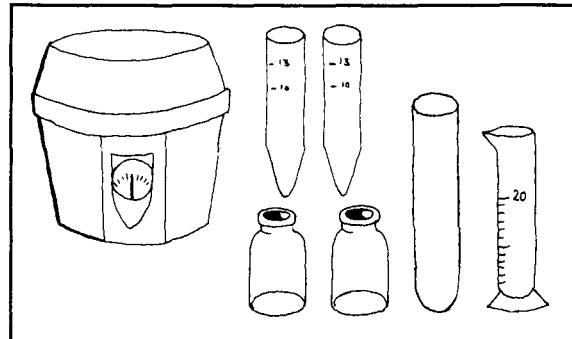
14. Recherche chimique du sang dans les selles

Principe

Quand l'hémoglobine du sang est en contact avec de l'eau oxygénée, cela produit de l'oxygène. Cet oxygène libéré se combine avec l'amidopyrine pour donner une coloration bleue.

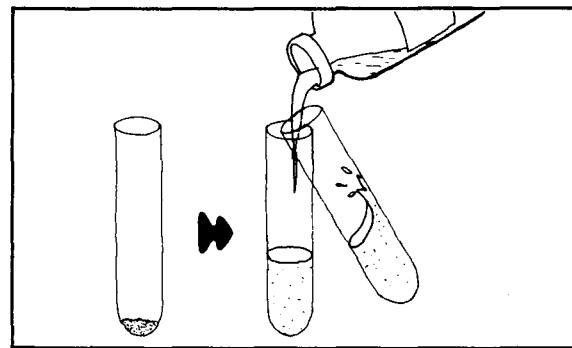
MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Centrifugeur
- Tube conique à centrifuger
- Applicateurs
- Eprouvette de 20 ml
- Tubes à essai
- Acide acétique à 10% (réactif No. 3)
- Eau oxygénée fraîche à 10 volumes
- Alcool à 95°
- Amidopyrine cristallisée (= Pyramidon).

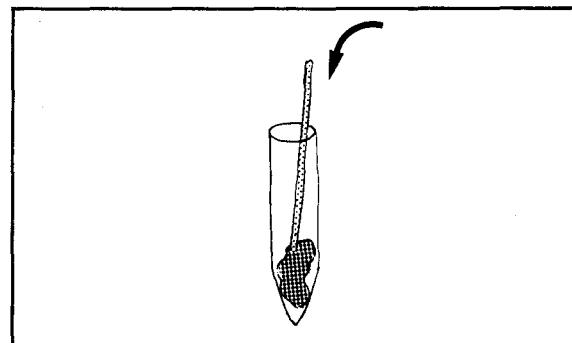


MÉTHODE

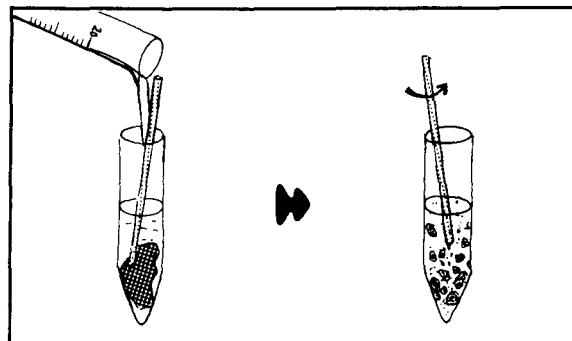
1. Juste avant la réaction, préparer la solution d'amidopyrine:
 - mettre environ 0,25 g d'amidopyrine dans le fond d'un tube à essai
 - ajouter 5 ml d'alcool à 95°.



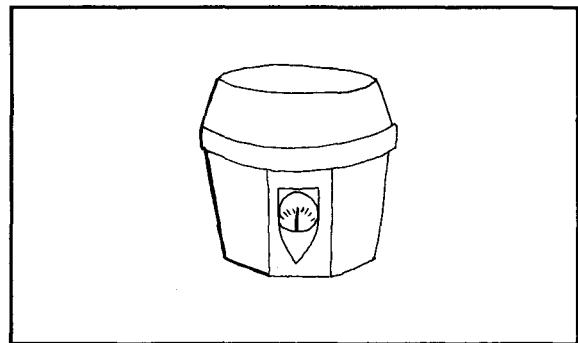
2. Placer un morceau de selles d'environ 4 ml (4 cm³) dans un tube à centrifuger.



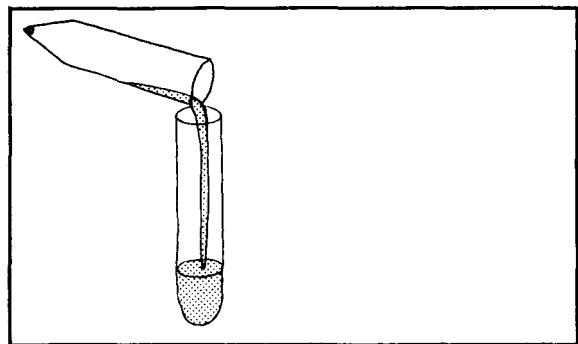
3. Ajouter 7 ml d'eau distillée et bien mélanger.



4. Centrifuger à vitesse réduite pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que les solides soient précipités éventuellement, avec un centrifugeur à main.



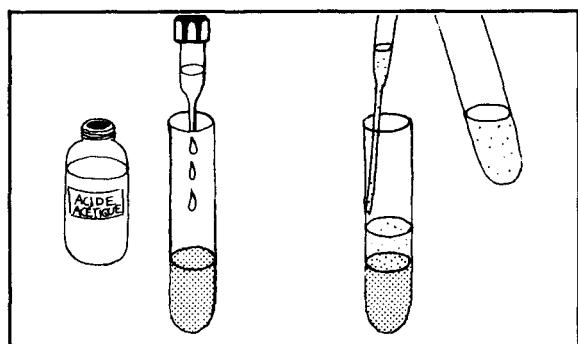
5. Verser le liquide surnageant dans un tube à essai et le conserver.



6. Ajouter dans le tube à essai sur ce liquide et sans mélanger:

- 10 gouttes d'acide acétique à 10%
- 5 ml de solution d'amidopyrine.

Pour éviter que les 2 liquides ne se mélangent, verser avec une pipette dont la pointe sera appliquée contre la paroi interne du tube.

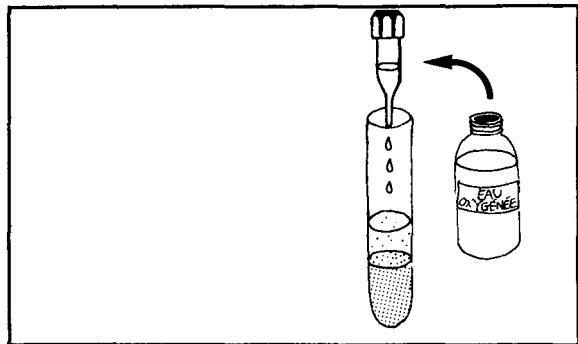


7. Ajouter ensuite:

- 10 gouttes d'eau oxygénée à 10 vol.

Ne pas mélanger

Attendre 1 minute.



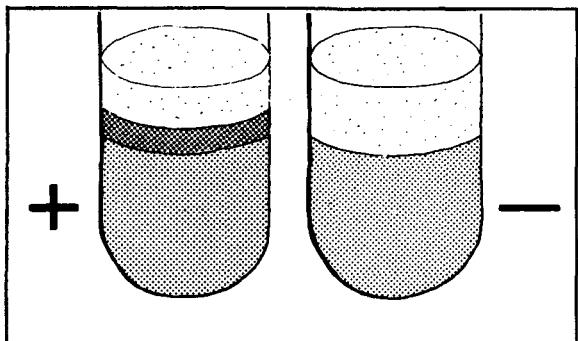
Réaction positive

Une coloration bleue apparaît entre les 2 liquides.

- bleu-clair = réaction positive +
- bleu-foncé = réaction très positive ++
- bleu-noir = réaction extrêmement positive +++.

Réaction négative

Pas de changement de couleur.



PRÉCAUTIONS À PRENDRE AU LABORATOIRE

La verrerie doit être propre (sans la moindre trace de sang).

La lecture du résultat sera faite dans les 5 minutes.

On peut faire des épreuves témoins:

- réaction négative: avec de l'eau distillée
 - réaction positive: avec du sang dilué à 1% dans l'eau.
-

PRÉCAUTIONS CONCERNANT LE MALADE

Le jour avant l'examen, le malade ne doit:

- ni manger de la viande
- ni prendre de médicament contenant un composé ferreux
- ni se brosser énergiquement les dents.

Note: Du fait des propriétés cancérogènes de ce produit, la réaction à la benzidine n'est plus conseillée.

15. Recherche des œufs de *Schistosoma haematobium* dans les urines

Les vers schistosomes (bilharzies), agents de la schistosomiase vésicale, rencontrée en Afrique et au Moyen-Orient, pondent leurs œufs dans les vaisseaux sanguins proches de la vessie. Les œufs passent dans l'urine, souvent accompagnés de sang.

Examen direct (après centrifugation)

On centrifuge les urines et on recherche la présence d'œufs dans le culot.

MATÉRIEL

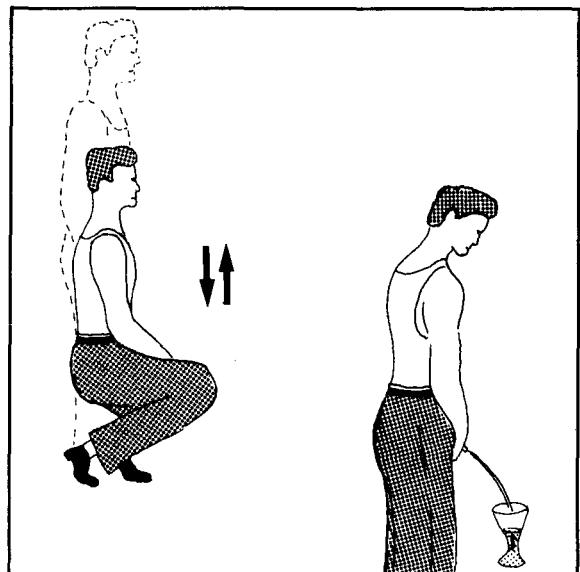
- Centrifugeur avec tube conique, et éprouvettes de 100 ml, 200 ml et 1000 ml
- Clarifiant: solution de soude à 10% (réactif No. 49)
- Conservateurs: acide chlorhydrique et eau de Javel.

OBTENTION DES URINES

Recueillir les urines entre 11 et 17 h; c'est le moment où elles sont le plus riches en œufs de schistosomes, notamment dans les dernières gouttes.

Epreuve d'effort préalable

On peut, juste avant la miction, faire effectuer au malade 20 flexions rapides, ou lui demander de courir 100 mètres, ou de monter et descendre plusieurs fois un escalier (ces exercices ont pour effet d'augmenter l'élimination des œufs).

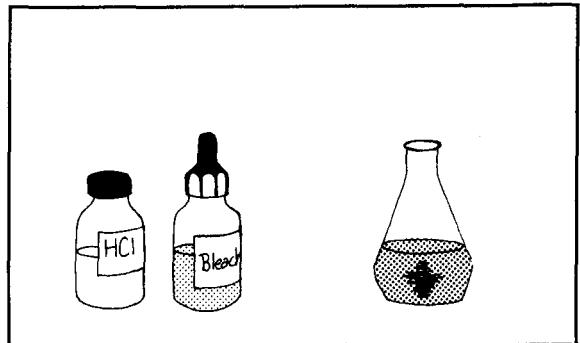


Conservation des urines

Si on ne peut examiner les urines immédiatement, y ajouter pour 100 ml d'urine:

- 1 ml d'acide chlorhydrique (20 gouttes)
- 2 ml d'eau de Javel (40 gouttes).

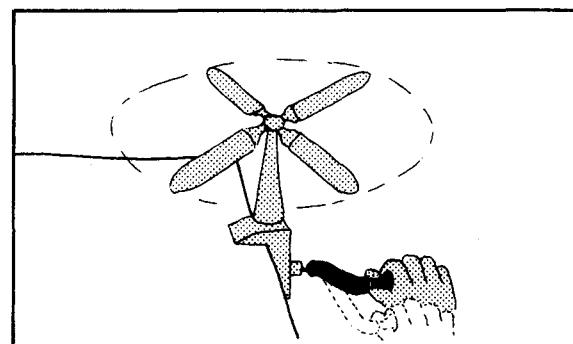
Les urines peuvent alors se conserver indéfiniment à température ambiante.



A. EXAMEN DIRECT

Centrifuger l'urine dans des tubes coniques (10 à 15 ml) pendant 5 minutes, à vitesse réduite, ou au centrifugeur à main.

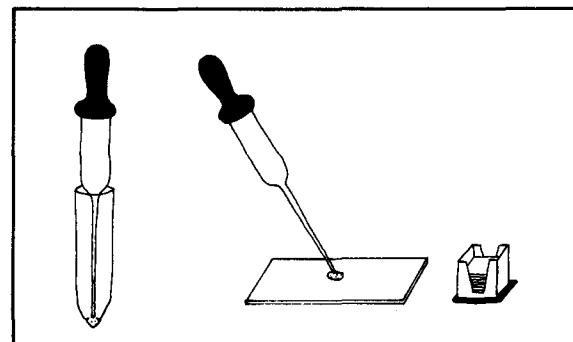
(Si l'urine renferme du sang, la traiter comme indiqué plus loin sous B.)



Après centrifugation, rejeter l'urine qui surnage.

Mélanger le culot de façon homogène en l'aspirant et en le refoulant avec un compte-gouttes capillaire.

Prélever une goutte du culot homogénéisé et le placer entre lame et lamelle. L'examiner à l'objectif 10 x.



Oeuf de Schistosoma haematobium

Taille 120 à 150 µm

Forme ovoïde avec un pôle bien arrondi

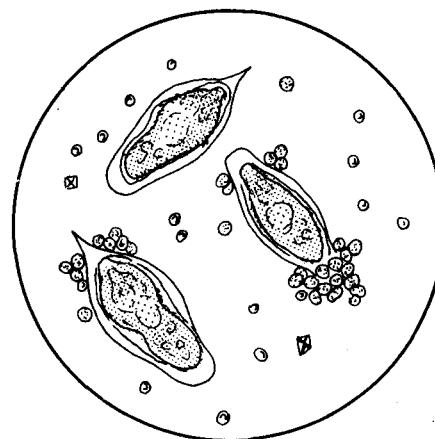
Coque lisse, très mince

Eperon terminal à un pôle

Couleur gris ou jaune

Contenu un embryon bien formé, pâle, large, avec de minuscules cils sur son pourtour.

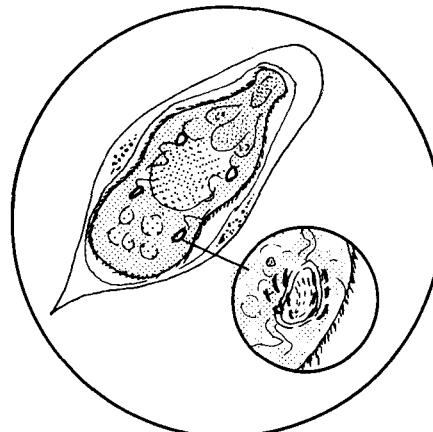
Souvent, l'oeuf est entouré d'amas de leucocytes qui peuvent cacher l'éperon terminal. (Voir photographie de l'oeuf page 134).



Viabilité des œufs

Cette recherche n'est possible que sur les urines fraîches, non traitées. L'oeuf est viable s'il manifeste encore des signes de vie, ce qui signifie que le malade héberge encore des vers vivants.

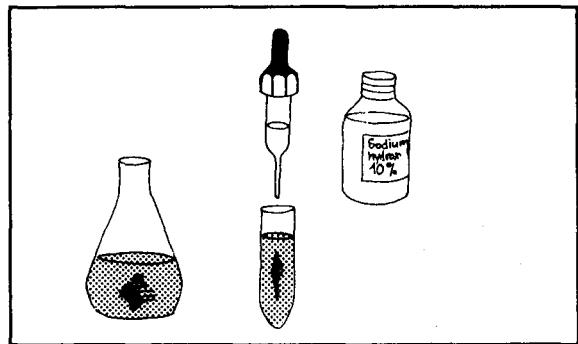
Examiner l'oeuf à l'objectif 40 x ou 100 x (sceller la lame à la paraffine fondu). Observer si l'embryon est encore légèrement mobile à l'intérieur de l'oeuf. Si ce n'est pas le cas, chercher les *cellules-flammes*: il y en a 4 placées aux 4 coins de l'embryon. On peut distinguer un mouvement continu et rapide des cils (brassage des liquides). Cela signifie que l'oeuf est vivant.



B. URINES CONTENANT DU SANG

S'il y a beaucoup de sang, l'examen est difficile, car les amas d'hématies peuvent cacher les œufs.

Ajouter à l'urine, dans le tube à centrifuger, 5 gouttes de solution de soude à 10% (réactif No. 49). La soude va lyser (dissoudre) les hématies et clarifier le culot. Les œufs en seront également affectés mais les coques resteront caractéristiques.



Oeuf de Schistosoma mansoni

Il peut être exceptionnellement trouvé dans les urines.
Il a un éperon latéral: voir description, page 135.

C. TECHNIQUE DE NUMÉRATION DES ŒUFS

1. Recueillir tout le contenu de la vessie et prélever 10 ml d'échantillon après avoir bien agité au préalable.
2. Centrifuger pendant 3 minutes à vitesse moyenne dans un tube à centrifuger gradué.
3. Vider le surnageant jusqu'à la marque 0,2 ml.
4. Très bien mélanger le reste et en transférer 0,1 ml sur une lame à l'aide d'une pipette graduée.
5. Compter les œufs au microscope, en utilisant un objectif à faible grossissement et un oculaire 5 ou 6 x.
6. Multiplier le résultat par 2 pour obtenir la concentration en œufs de 10 ml d'urine.

Examen d'une biopsie de la muqueuse rectale

Le médecin peut demander au laboratoire de rechercher la présence d'œufs de schistosomes dans une biopsie de la muqueuse rectale, et cela pour dépister différentes schistosomiases ou pour suivre les progrès d'un traitement.

Examiner une préparation à l'état frais.

Aplatir un petit fragment de biopsie entre une lame et une lamelle.

Examiner au microscope (objectif 10 x).

Les œufs de schistosomes sont faciles à repérer et à reconnaître.

L'examen de la biopsie rectale est souvent utile pour la recherche de *S. haematobium*. Le résultat peut être positif, alors même que l'examen des urines reste négatif.

16. Autres parasites susceptibles d'être découverts dans les urines

A part les œufs de schistosome (voir page 178) que l'on peut trouver en Afrique et au Moyen-Orient, les parasites sont rares dans les urines.

On peut cependant trouver dans les culots de centrifugation des urines les parasites suivants:

1. Un protozoaire flagellé *Trichomonas vaginalis*
2. Des microfilaires *Wuchereria bancrofti* et autres
3. Un spirochète *Leptospira ictero-haemorrhagiae*

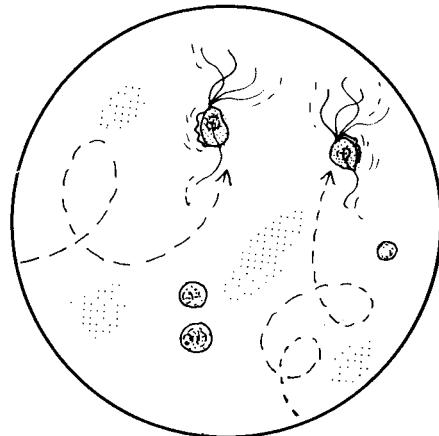
1. PROTOZOAires FLAGELLÉS

Trichomonas vaginalis

On le recherche dans les exsudats génito-urinaires (voir page 186).

Mais on peut aussi trouver des Trichomonas encore mobiles et caractéristiques dans les culots d'urines fraîches.

Taille	15 µm
Forme	ronde, globulaire
Mouvement	tourbillonne et tourne, vire
Membrane ondulante	comme la nageoire d'un poisson, sur un côté seulement, très mobile
Flagelle	4 flagelles.

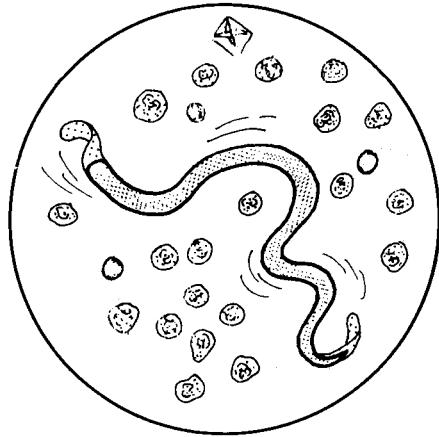


2. MICROFILAIRES

Wuchereria bancrofti

Aspect de l'urine: *laiteuse*, à cause de la présence de chyle provenant de vaisseaux lymphatiques endommagés: "chylurie". Les microfilaires sont encore mobiles (taille 200 à 300 µm de long, sur 8 de large). Elles dessinent des courbes régulières. Voir leur description à la page 212.

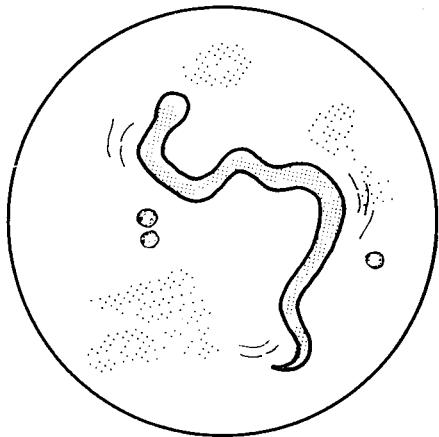
On parvient à voir la gaine de la microfille dans l'urine. Il y a aussi généralement de nombreux leucocytes.



Onchocerca volvulus

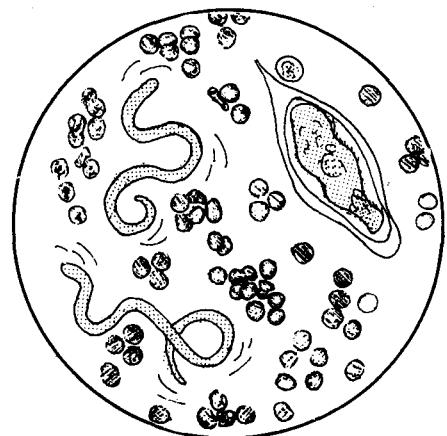
Très rarement (5 à 10% des cas) les microfilaires de l'onchocercose passent dans l'urine où elles sont retrouvées encore mobiles.

Taille: 200 à 300 µm de long sur 8 de large. Courbures anguleuses. Pas de gaine. Tête un peu élargie: voir description, page 218.
Un étalement à l'état frais pourra confirmer le résultat.



Microfilaires sanguines accidentelles

Les malades atteints de schistosomiase peuvent être infectés à la fois par des schistosomes vésicaux et par des filaires. L'infection par les schistosomes provoque une perte de sang dans l'urine et ce sang entraîne des microfilaires sanguines telles que *W. bancrofti*, *Loa-loa* et *D. perstans* (voir descriptions, pages 212 et 213). De très nombreuses hématies sont également présentes dans le culot urinaire.



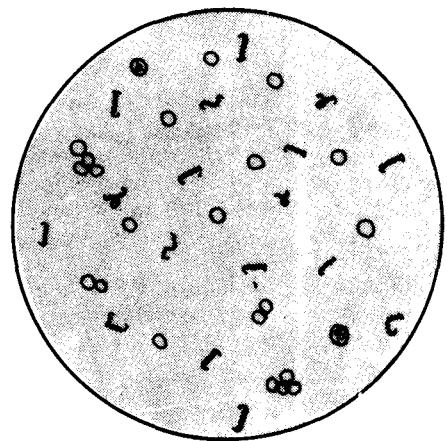
3. SPIROCHÈTES

Leptospira ictero-haemorrhagiae

La leptospirose est transmise par les rats. Cette maladie est surtout fréquente en Asie. Si on en soupçonne la présence, il faut examiner le culot à l'état frais avec un éclairage très réduit ou dans une préparation faite avec la coloration de Giemsa.

Longueur très variable; 10 à 20 µm en moyenne
Forme en spirale: 20 à 40 spires; ressemble à un ressort comprimé
Extrémités effilées, souvent recourbées en crochet
Mouvement ondule et tourne sur lui-même
Coloration Gram négatif faible; se colore mieux au Giemsa.

On peut isoler le *Leptospira* par culture sur des milieux spécifiques.



Ne pas prendre pour des parasites:

des *Spermatozoïdes*, qui peuvent être retrouvés encore mobiles dans les culots d'urine fraîche de l'homme (voir description, page 329).

Contamination des urines par les selles:

Si des urines sont contaminées par des selles, des parasites présents dans les échantillons de selles peuvent également être découverts dans le culot urinaire.

17. Oeufs de douve du poumon; autres parasites

LA DOUVE DU POUMON – *Paragonimus westermani*

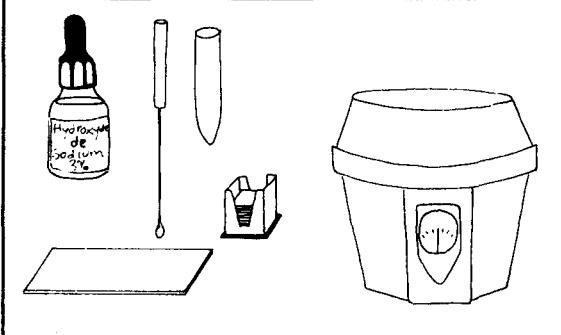
Ce ver plat, en forme de grain de café, se fixe dans les bronches. Le malade s'infecte en consommant des crabes de rivière, insuffisamment cuits. Ses crachats sont bruns rouillés.

Localisation mondiale des douves du poumon



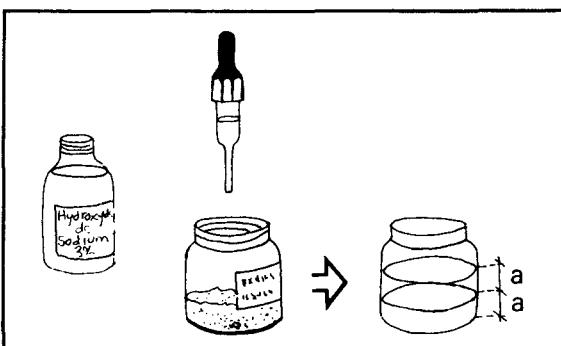
Matériel

- Centrifugeur
- Tubes coniques à centrifuger
- Agitateur en verre
- Anse de platine
- Lame
- Lamelles
- Solution de soude à 3% (réactif No. 48).

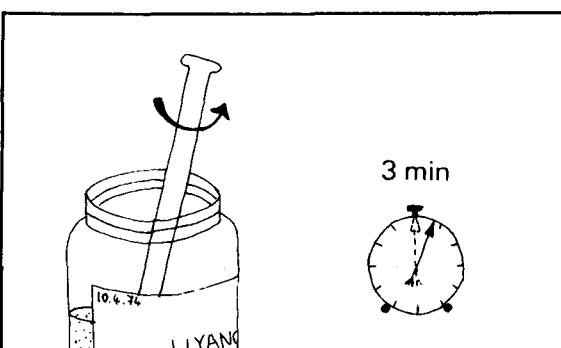


Méthode

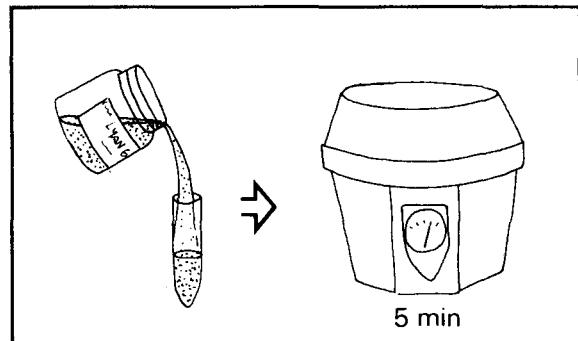
1. Dans le pot, ajouter au crachat une quantité égale de soude à 3%.



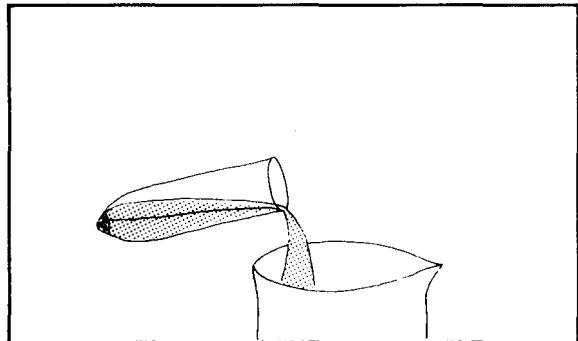
2. Bien mélanger pendant 3 minutes.



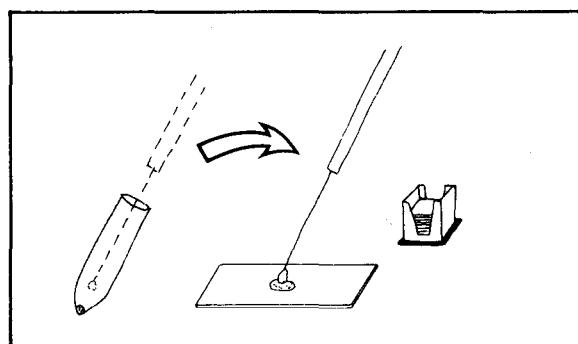
3. Verser tout le mélange dans un tube à centrifuger.
Centrifuger pendant 5 minutes à grande vitesse.



4. Jeter le liquide surnageant.



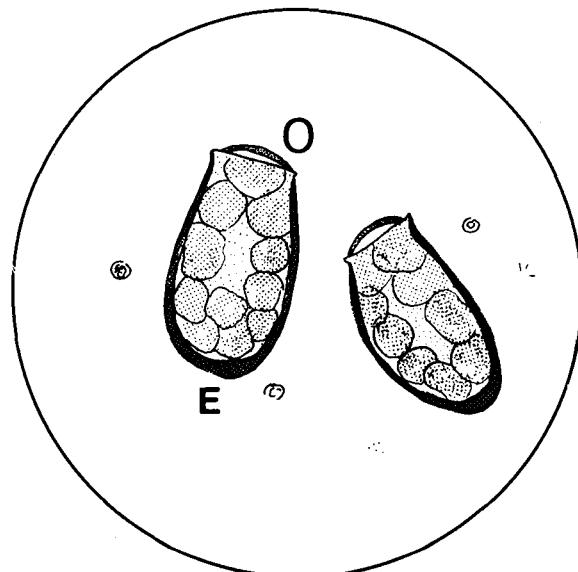
5. Prendre une goutte du culot avec l'anse de platine et la déposer sur une lame. Examiner au microscope, entre lame et lamelle (objectifs 10 x et 40 x).



Oeufs de douve du poumon

Taille	100 µm de long
Forme	ovale, avec souvent un côté un peu aplati
Couleur	brun doré
Opercule (O)	aplati, avec un rebord visible, comme un petit chapeau posé sur l'oeuf
Coque	lisse, avec un épaississement marqué (E) au pôle opposé à l'opercule
Contenu	espace central clair entouré de cellules.

(voir photographie, page 141)



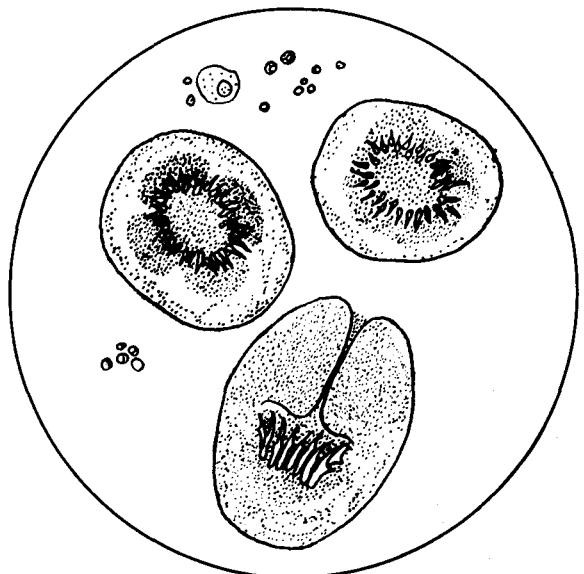
AUTRES PARASITES TROUVÉS DANS LES CRACHATS

Scolex hydatique

Les malades infectés par un ténia, *Echinococcus granulosus* (au contact d'un chien) peuvent parfois présenter un *kyste hydatique du poumon*. En cas de rupture du kyste dans les bronches, on trouvera des scolex dans les crachats, qui peuvent renfermer du sang.

Taille	environ 150 µm
Forme	ronde, irrégulière ou ovale, avec un pôle un peu aplati
Contenu	incolore et transparent, puis finement granuleux, mais avec une <i>couronne de crochets</i> bien nette (10 à 30 crochets).

L'échinococcose sévit dans les pays d'élevage de moutons: Afrique du Nord, Arabie Saoudite, Argentine, Australie, Chili, Egypte, Nouvelle-Zélande et Uruguay.



18. *Trichomonas*: examen direct des écoulements génito-urinaires, etc.

Principe

Trichomonas vaginalis est un protozoaire qui peut provoquer des écoulements génito-urinaires (exsudats), surtout chez la femme, et parfois aussi chez l'homme. On le recherche au microscope dans des préparations à l'état frais.

L'écoulement est blanchâtre et plus ou moins clair; il peut aussi être gris verdâtre, mousseux ou écumeux.

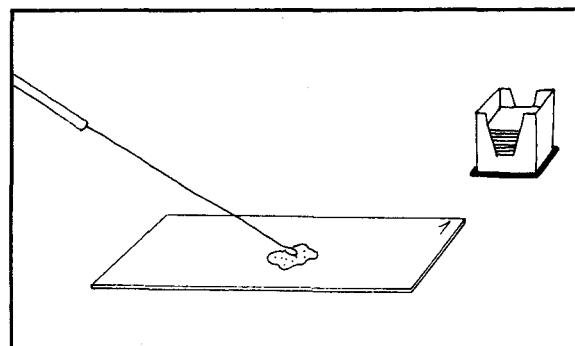
MATÉRIEL

- Lames de verre
- Lamelles
- Soluté physiologique (réactif No. 47), tiède si possible
- Anse de platine.

PRÉLÈVEMENT

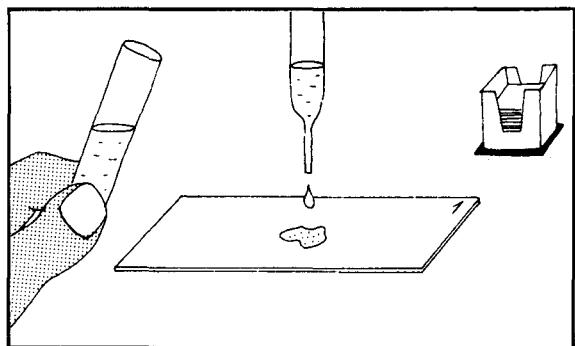
Chez la femme: l'écoulement doit être porté au laboratoire immédiatement après prélèvement (dans un tube ou sur une lame). Le mieux est d'utiliser un écouvillon-coton placé dans un tube à essai contenant du soluté physiologique; le trichomonas reste mobile quelque temps (généralement plusieurs heures).

Chez l'homme: prélever au laboratoire comme indiqué pour la recherche des gonocoques (voir page 243). Examiner immédiatement.



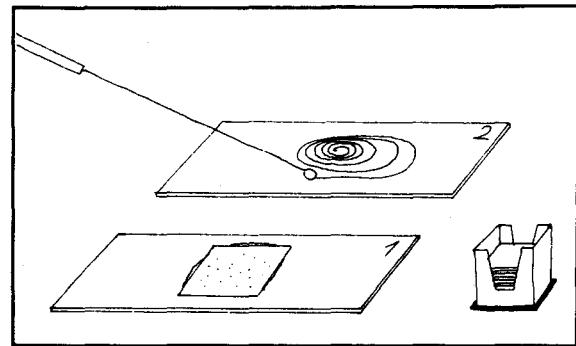
MÉTHODE

1. Placer une goutte d'écoulement sur une lame.



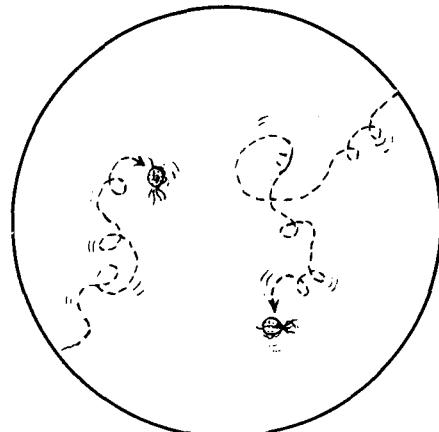
2. Ajouter une goutte de soluté physiologique tiède.
Mélanger et recouvrir d'une lamelle.

3. Faire ensuite un vaste étalement très mince de l'écoulement sur une 2ème lame.



4. Examiner aussitôt à l'objectif 10 x

Rechercher de petits organismes ronds, transparents, de la taille d'un globule blanc, qui avancent par à-coups en tournant très vite.

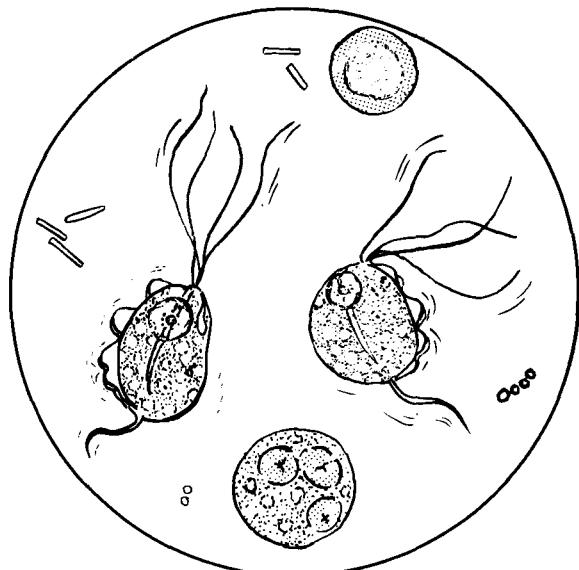


5. Examiner à l'objectif 40 x pour observer le trichomonas.

Taille environ 15 µm (10 à 20 µm)
Forme ronde, globuleuse
Mouvement tourbillonne, tourne, semble vibrer

Membrane ondulante: comme la nageoire d'un poisson, d'un côté seulement, très mobile (mouvement d'ondulation rapide)

4 flagelles: comme des fouets, très mobiles; impression très nette de mouvement.



Lame avec étalement

Si on ne trouve rien dans la goutte examinée entre lame et lamelle, colorer l'étalement sec sur la deuxième lame par le Gram. Y chercher des bactéries (gonocoques?).

Champignons

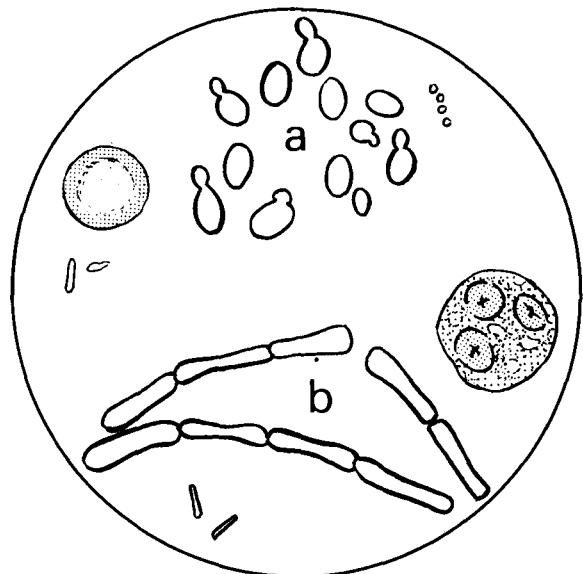
Trouvés dans des écoulements épais, blancs (parfois jaunes ou incolores). A l'objectif 40 x, rechercher:

(a) *Des levures*

- organismes ovales ou ronds
- immobiles
- de tailles inégales (2 à 6 μm)
- certains portent des bourgeons.

(b) *Des filaments mycéliens (quelquefois)*

- filaments à extrémités arrondies
- longueur variable (20 à 100 μm)
- 2 à 4 μm de largeur.



19. Préparation d'une goutte épaisse et coloration de Field

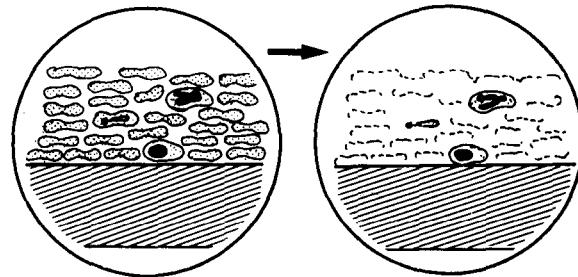
But

Recherche des parasites du sang

1. Une goutte de sang du doigt est déposée sur une lame où elle est étalée et séchée.
2. Elle est colorée et examinée au microscope pour la recherche des parasites suivants:
 - parasites du paludisme
 - microfilaires
 - trypanosomes
 - borreliae.
3. Les gouttes épaisses permettent de trouver les parasites:
 - plus rapidement
 - même s'ils sont peu nombreux.

Principe

1. Pendant la coloration de la goutte de sang séchée, l'hémoglobine des hématies est dissoute et enlevée par l'eau du colorant.



2. Il ne reste que:

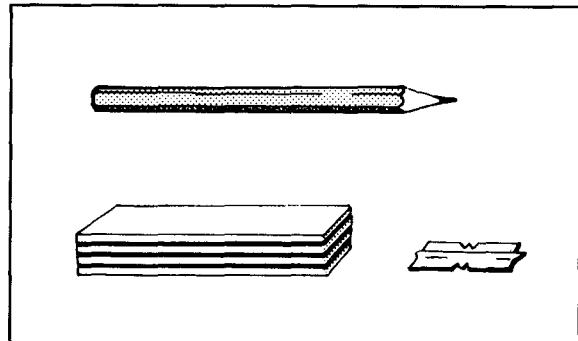
- les parasites et
- les globules blancs

qui peuvent être vus au microscope.

PRÉPARATION D'UNE GOUTTE ÉPAISSE

Matériel

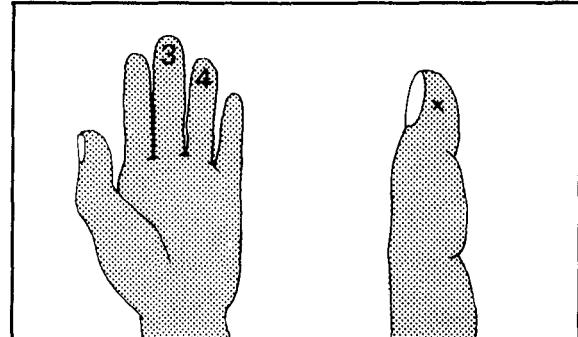
- Lames de verre propres (pour le nettoyage, voir page 31)
- Lancette stérile
- Méthanol
- Coton hydrophile
- Crayon gras.



Méthode

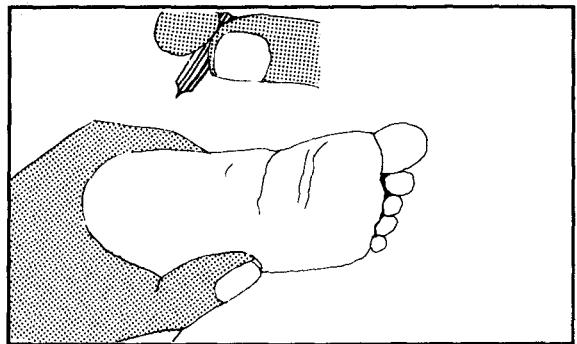
Piqûre du doigt

1. Choisir l'emplacement de la piqûre comme indiqué ci-contre:
 - au 3ème ou au 4ème doigt de la main gauche
 - sur le côté qui est moins sensible que le bout du doigt.



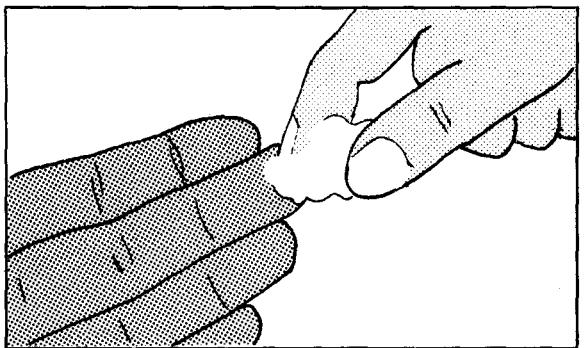
Chez les nourrissons de moins de 6 mois:

- piquer le talon ou le gros orteil.

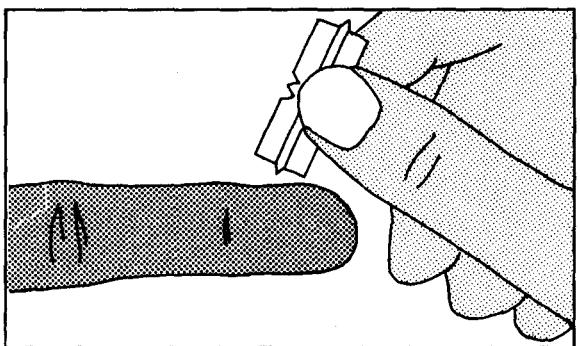


2. Nettoyer l'endroit choisi:

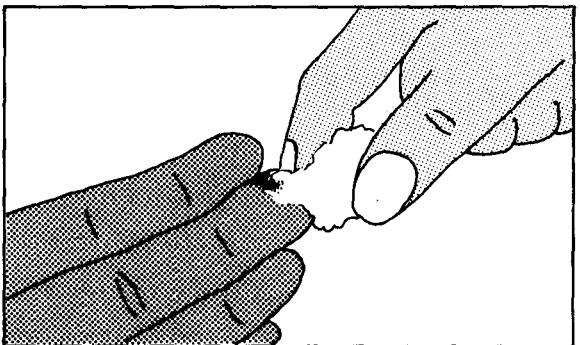
- d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool, puis
- avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool.



3. Piquer d'un coup sec et rapide.



4. Essuyer la première goutte de sang avec un tampon de coton sec.

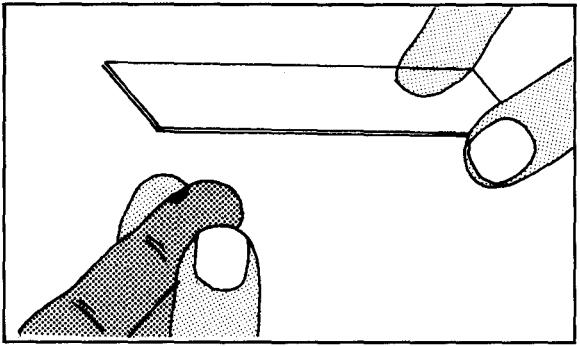


5. De la main droite:

- prendre une lame en la tenant par les bords.

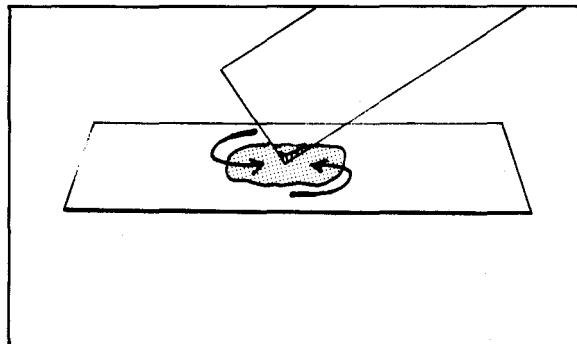
De la main gauche:

- presser le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang de cette grosseur environ: Ø



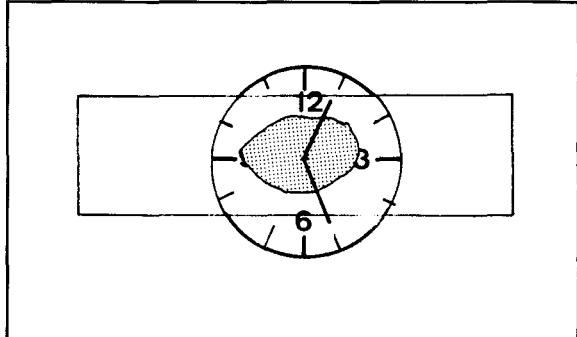
Préparation de l'étalement

6. Faire un étalement épais, au centre de la lame. Etaler le sang avec le coin d'une lame propre, jusqu'à épaississement uniforme. Les étalements trop minces ou trop épais ne se colorent pas bien.



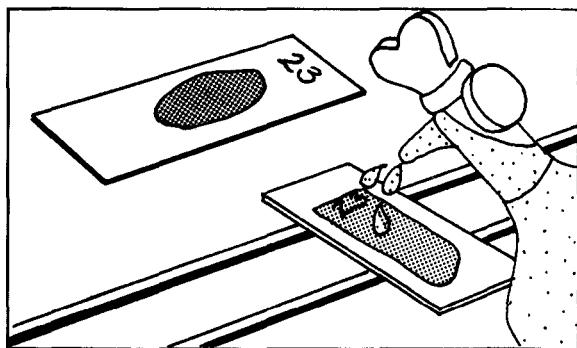
Quand la coloration est bonne, on peut distinguer, à travers, les aiguilles d'une montre, mais pas les chiffres.

[Un étalement mince pourra être utile si l'on a du mal à identifier l'espace de parasite du paludisme. Procéder alors comme il est dit à la page 387.]



7. Au bout de la lame, inscrire au crayon gras le numéro du malade. Laisser sécher à l'air, par exemple sur un plan de travail ensoleillé, à condition de protéger l'étalement contre les mouches et la poussière. Un ventilateur électrique, si l'on en possède un, accélérera le séchage tout en éloignant les mouches.

Les étalements minces devraient sécher à l'air et être immédiatement fixés au méthanol (alcool méthylique).



COLORATION DE GOUTTES ÉPAISSES DE SANG À L'AIDE DES COLORANTS RAPIDES DE FIELD

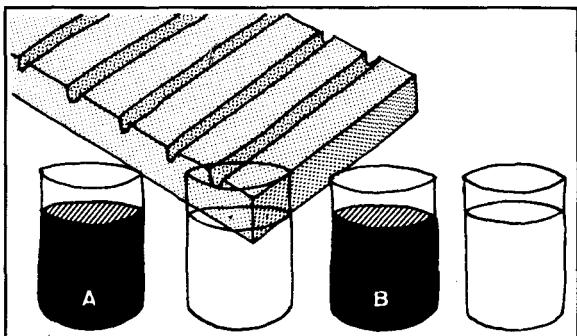
Les colorants A et B de Field, que l'on utilise dans bien des régions du monde pour colorer les gouttes épaisses de sang, présentent les avantages suivants:

- la coloration est rapide
- il n'est pas nécessaire de diluer les colorants
- les colorants peuvent être utilisés plusieurs jours de suite (filtrer tous les deux jours; changer le colorant quand le résultat cesse d'être satisfaisant)
- on n'a pas besoin d'eau tamponnée; de l'eau ordinaire propre suffit pour laver les étalements.

Le colorant de Giemsa dilué, utilisé pour les étalements minces, peut aussi être employé pour les gouttes épaisses (voir page 393).

Matériel

- Colorant A de Field (réactif No. 25A)
- Colorant B de Field (réactif No. 25B)
- Deux récipients d'eau ordinaire, propre
- Râtelier à lames.



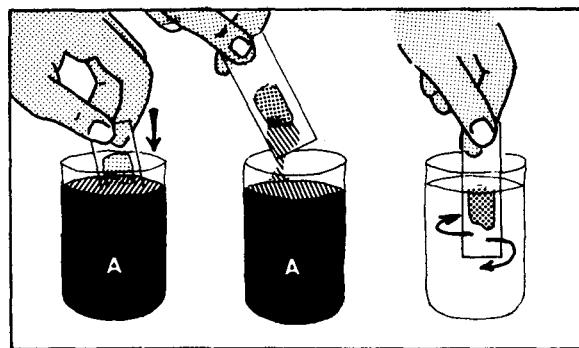
Méthode

1. Tremper dans le colorant A de Field la lame sur laquelle est étalée la goutte épaisse séchée:

— compter jusqu'à 10.

Faire égoutter la lame.

La laver dans un récipient d'eau ordinaire.



2. Tremper la lame dans un récipient contenant du colorant B de Field:

— compter jusqu'à 10.

Faire égoutter la lame.

Bien la laver dans un récipient d'eau ordinaire.

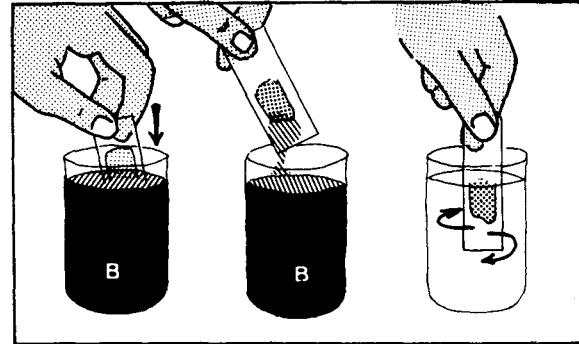
Note: On peut être amené à modifier le temps de coloration.

Si la coloration est trop bleue:

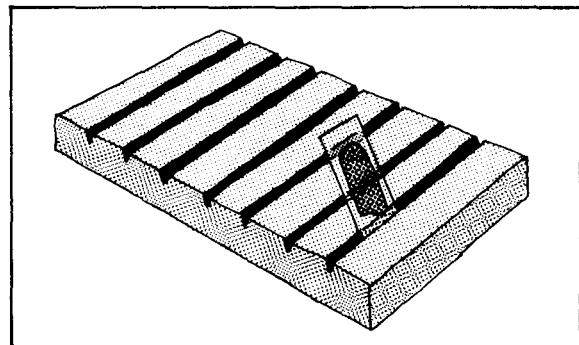
— tremper plus longtemps dans le colorant B.

Si la coloration est trop rose:

— tremper plus longtemps dans le colorant A.



3. Laisser sécher à l'air libre, sur un râtelier à lames (la face portant la goutte vers le bas).



RÉSULTATS

La coloration doit être mauve. Cela permet de reconnaître un trophozoïte du paludisme:

- le pourtour cytoplasmique se colore en bleu
- la chromatine se colore en rouge foncé.

Pour le diagnostic des espèces, voir pages 200 et 201.

On distingue aussi dans les gouttes épaisses:

- les globules blancs, leur type et leur nombre approximatif
- les noyaux de normoblastes, teintés en rouge sombre
- les réticulocytes, qui apparaissent comme des zones circulaires de points bleus.

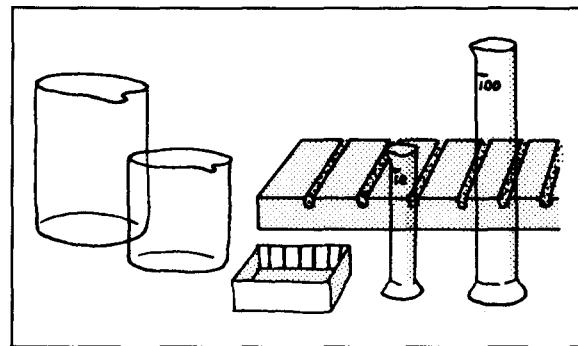
20. Coloration de Giemsa (gouttes épaisses et étalements minces)

Important:

Pour l'établissement de la formule leucocytaire les meilleures colorations sont celles de May-Grünwald et de Giemsa (voir page 393).

MATÉRIEL

- Eprouvettes de 10, 50 et 100 ml
- Béchers de 50 et 250 ml
- Cuves à coloration
- Agitateur
- Pissette
- Pinces à lame
- Râtelier à lames
- Minuterie
- Colorant de Giemsa (réactif No. 31)
- Méthanol dans un flacon compte-gouttes
- Eau tamponnée (voir préparation, page 61).



MÉTHODE pour moins de 10 lames

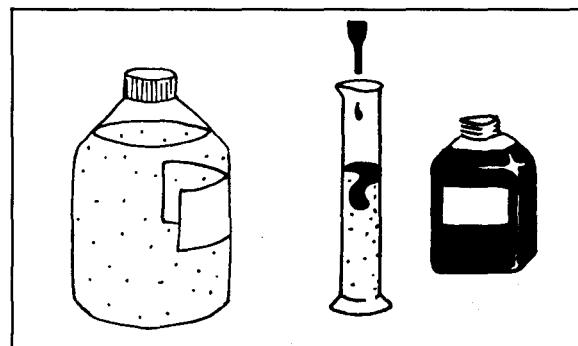
Important:

Colorer aussitôt les gouttes épaisses à l'aide de colorant de Giemsa dilué. Les étalements minces seront d'abord fixés pendant 2 à 3 minutes au méthanol (voir page 391).

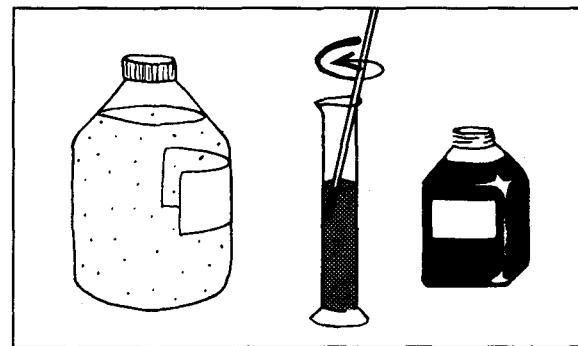
1. Faire une dilution (1:10) de colorant de Giemsa.

Exemple

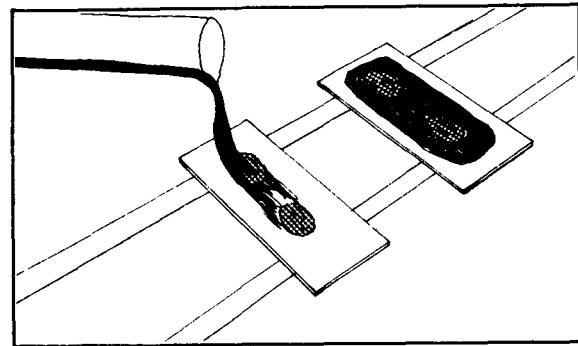
Utiliser 18 ml d'eau tamponnée et 2 ml de colorant, quantités suffisantes pour 4 lames. Si l'on doit colorer davantage de lames, augmenter le colorant en conséquence.



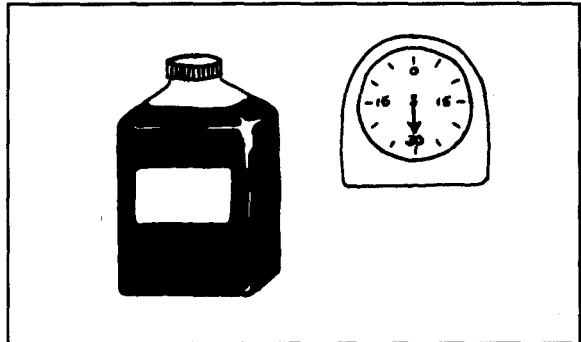
2. Mélanger délicatement avec un agitateur en verre.



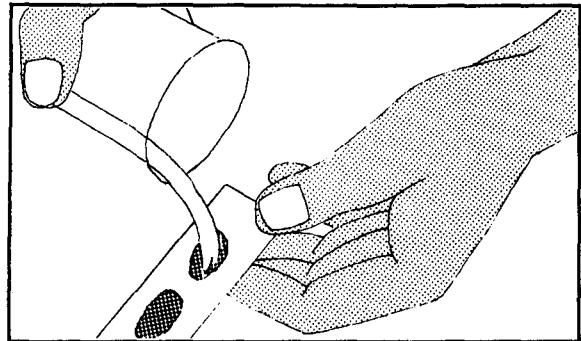
3. Placer les lames à colorer sur 2 baguettes de verre. Couvrir avec le colorant de Giemsa dilué.



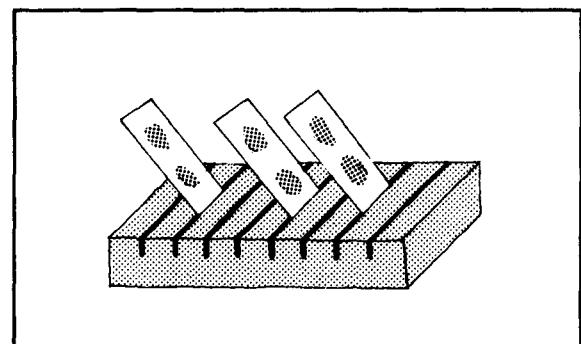
4. Laisser agir 30 minutes.
(Le temps de coloration est indiqué par le fabricant: modifiez-le, après quelques essais, si nécessaire. Si la coloration est trop pâle, laisser agir le colorant plus longtemps.)



5. Laver le colorant à l'eau tamponnée. Ne pas le laisser s'égoutter avant de laver, car il resterait un dépôt de colorant sur la goutte.

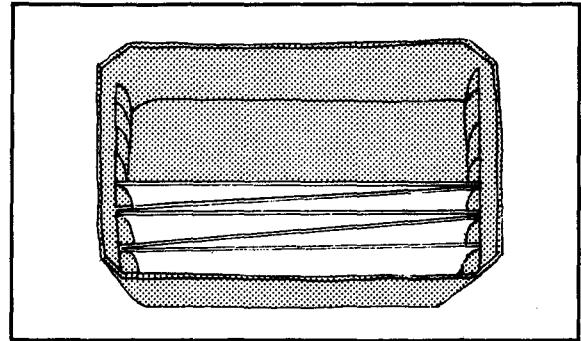


6. Egoutter les lames lavées. Les faire sécher sur un râtelier en les inclinant la face avec le sang coloré tournée vers le bas pour les protéger des poussières de l'air. Il est déconseillé de sécher les lames colorées en les pressant entre des feuilles de papier-filtre.

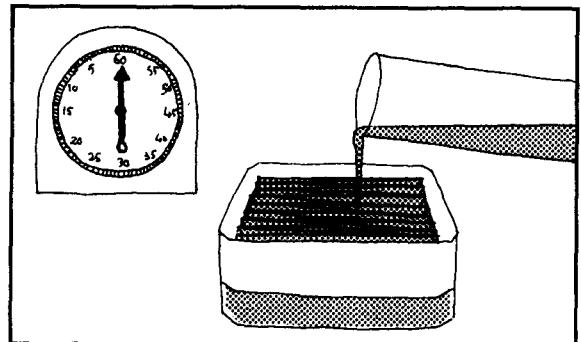


MÉTHODE à utiliser pour un grand nombre de lames

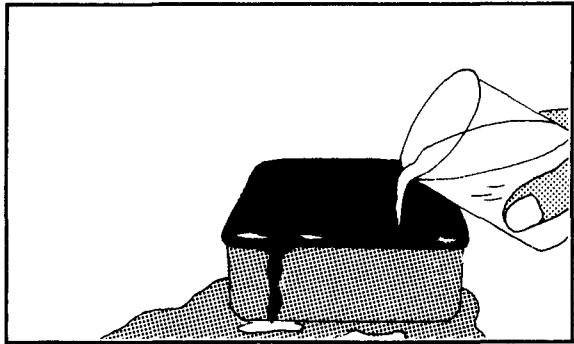
1. A l'aide d'une pince, mettre les lames une par une dans les rainures de la cuve à coloration, selon un schéma en Z.
(Les étalements minces auront au préalable été fixés pendant 2 à 3 minutes au méthanol.)



2. Préparer suffisamment de colorant pour remplir la cuve.
Le verser lentement dans la cuve contenant les lames.
Couvrir.
Laisser agir pendant 30 minutes, à l'abri du soleil.

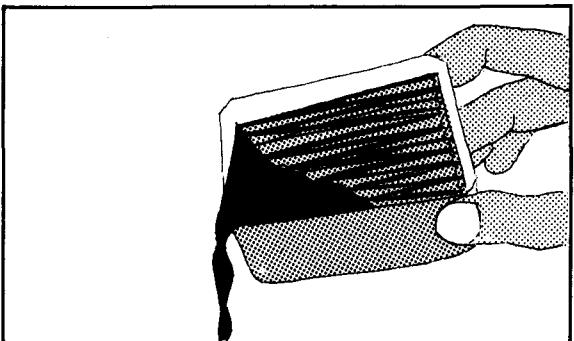


3. Enlever le couvercle. Verser doucement de l'eau propre dans la cuve, d'un bécher, pour enlever l'écume de la surface du colorant.

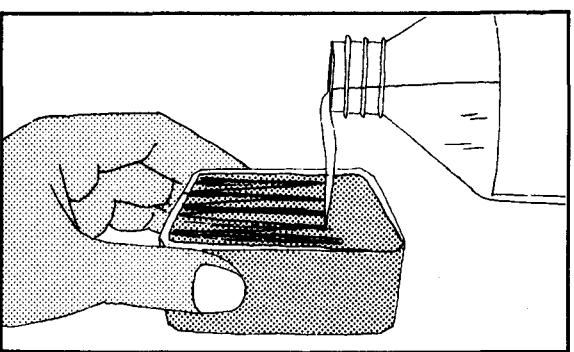


4. Vider doucement la cuve de tout le colorant.

Dans certains laboratoires dont les fournitures sont limitées, on réutilise le Giemsa dilué pour d'autres colorations; en ce cas, l'employer le jour même.

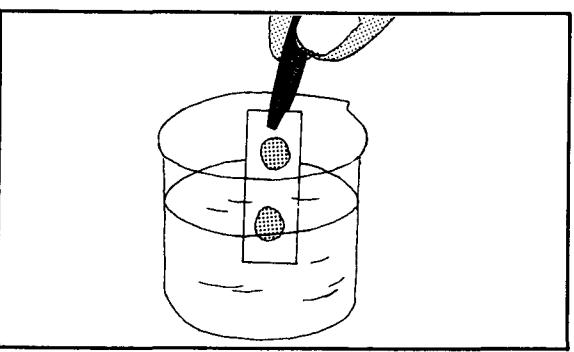


5. Remplir la cuve d'eau tamponnée.



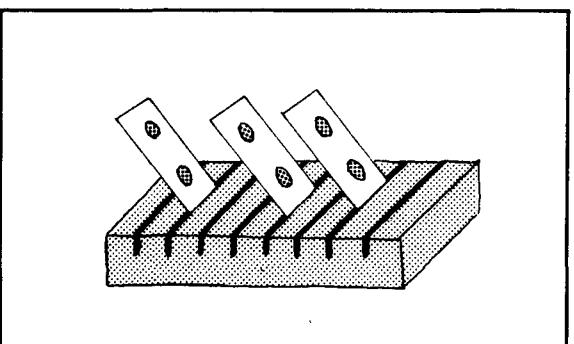
6. Retirer les lames une à une à la pince.

Les plonger dans un grand bécher rempli d'eau ordinaire, délicatement, pour ne pas décoller la goutte épaisse colorée.



7. Egoutter les lames.

Les faire sécher sur un râtelier (la face qui porte la goutte tournée vers le bas).



21. Identification des parasites du paludisme

Les parasites responsables du paludisme sont présents dans le sang des malades; ils se développent en partie à l'intérieur des hématies. On les recherche dans des étalements de sang colorés à l'aide de colorants de Field ou de Giemsa.

PRÉPARATION DES ÉTALEMENTS DE SANG

1. Quand doit-on faire le prélèvement?

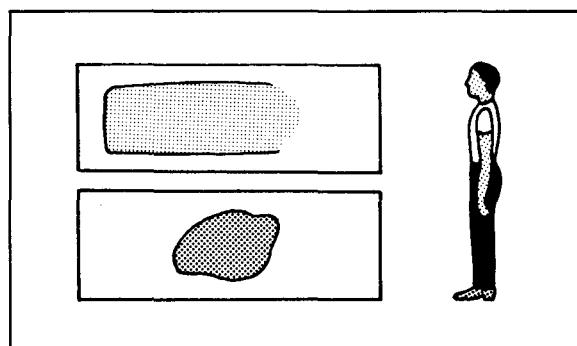
Les parasites sont généralement plus nombreux dans le sang vers la fin de l'accès de fièvre.

Toujours prélever le sang *avant* d'administrer des médicaments antipaludiques.

2. Malades individuels

Préparer:

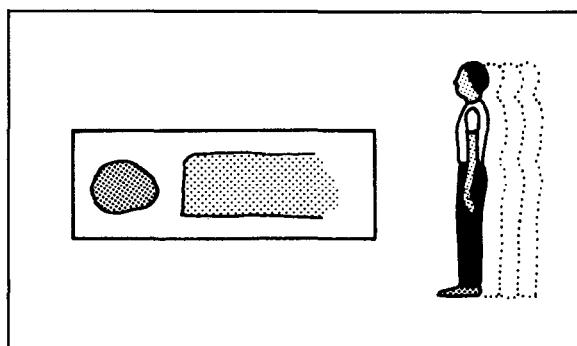
- 1 lame avec un étalement mince (voir page 387) pour d'éventuelles identifications délicates d'espèces
- 1 lame avec une goutte épaisse (voir page 189) pour la recherche des parasites.



3. Enquêtes de masse

Préparer:

- 1 seule lame par personne, portant 1 goutte épaisse et 1 étalement mince.



4. Conservation des lames

Il est déconseillé de garder les lames plus de 4 jours avant coloration.

Pour les lames colorées immédiatement, utiliser la coloration de Field; pour celles qui doivent attendre quelques jours, employer le Giemsa.

COLORATION DES LAMES

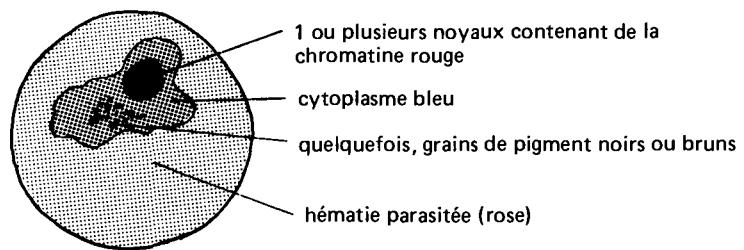
Fixation

Avant de colorer, fixer les étalements minces uniquement au méthanol. Prendre soin de ne pas laisser l'alcool entrer en contact avec la goutte épaisse.

(Pour les techniques de coloration, se reporter aux pages 191 et 393).

IDENTIFICATION DES PARASITES DU PALUDISME

PARASITES DU PALUDISME (coloré)



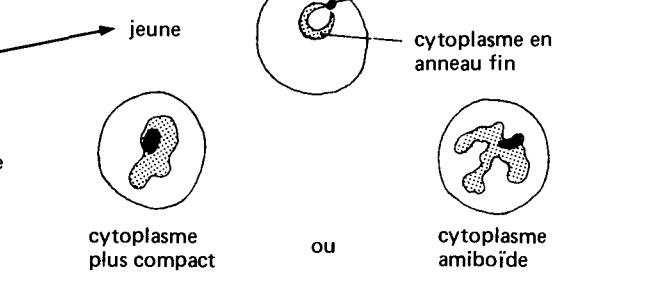
STADES DE DÉVELOPPEMENT

Les parasites découverts dans le sang des malades en sont à différents stades de développement.

1. Trophozoïte

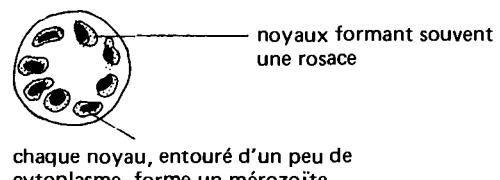
Stade précoce avec 1 noyau vivant à l'intérieur de l'hématie

adulte



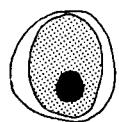
2. Schizonte

Trophozoïte âgé dont le noyau s'est divisé en 8 à 24.
Remplit presque toute l'hématie



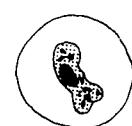
3. Gamétocyte

Forme sexuée avec 1 gros noyau compact et arrondi ou allongé



Pigment

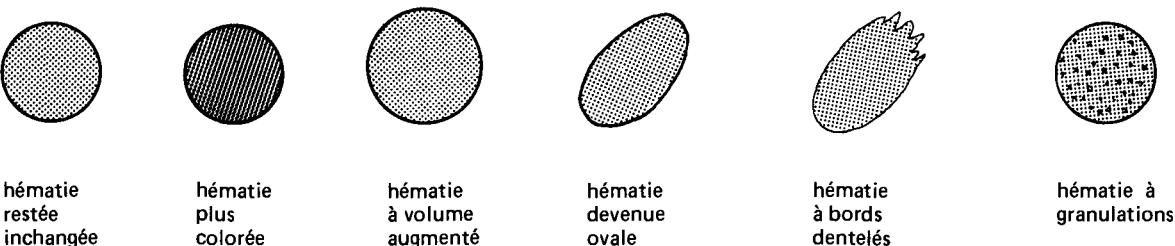
Le cytoplasme de certains parasites comporte des grains de pigment; d'autres n'en ont pas



HEMATIES PARASITEES

Etalements minces

Les hématies parasitées peuvent rester identiques ou changer de couleur ou de forme, ou encore contenir des granulations roses (granulations de Schüffner).

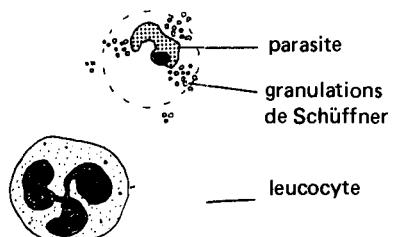


Gouttes épaisses

Les hématies ont pratiquement disparu.

Les granulations roses de Schüffner apparaissent encore autour du parasite.

Les leucocytes restent inchangés.

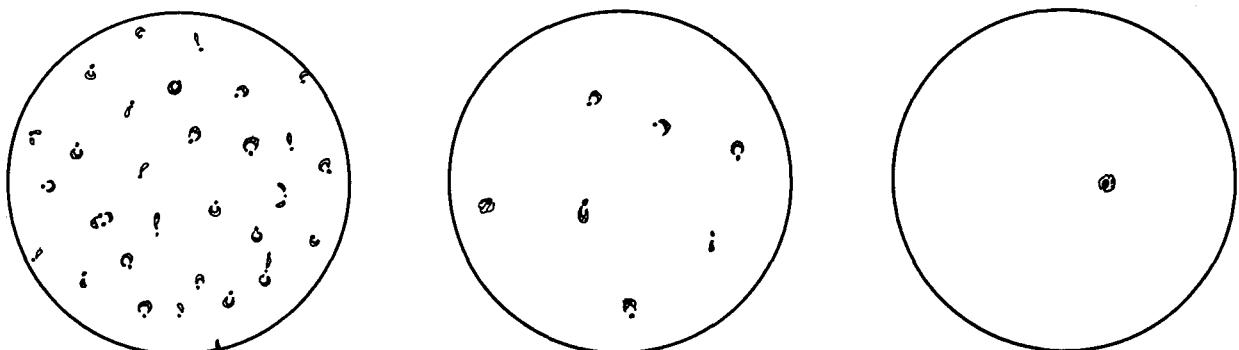


DENSITÉ PARASITAIRE

C'est le nombre de parasites par champ microscopique.

Elle varie généralement selon l'espèce, il peut donc être utile de l'apprécier *dans les gouttes épaisses*.

Il importe de mentionner la densité parasitaire dans le rapport d'analyse (voir page 203).



densité parasitaire élevée:
20 parasites par champ
(ou plus)

densité parasitaire moyenne:
2 à 19 parasites
par champ

densité parasitaire faible:
1 parasite par champ
(ou moins)

ESPÈCES DE PARASITES

Il y a 4 espèces de parasites du paludisme humain.

Plasmodium falciparum
Plasmodium malariae
Plasmodium ovale
Plasmodium vivax

Pour le pronostic et le traitement de la maladie, il importe d'identifier l'espèce en cause au laboratoire. Cependant, même s'il n'est pas possible d'identifier l'espèce elle-même, il faut toujours signaler la présence de parasites du paludisme.

Par exemple:

Un paludisme à *P. falciparum* est beaucoup plus grave qu'un paludisme à *P. malariae* et peut même parfois entraîner la mort.

En revanche, s'il n'est pas bien soigné, un paludisme à *P. malariae* peut persister beaucoup plus longtemps qu'une atteinte à *P. falciparum*.

On peut trouver plusieurs espèces associées chez le même malade.

Par exemple:

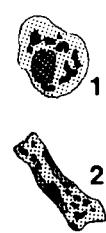
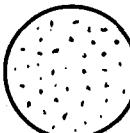
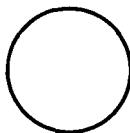
Plasmodium falciparum et
Plasmodium malariae

Plasmodium falciparum et
Plasmodium vivax

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE

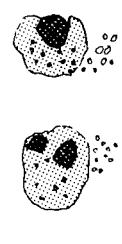
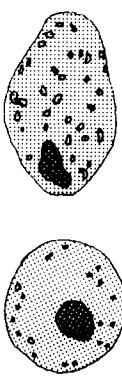
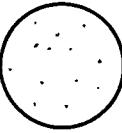
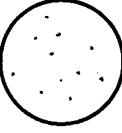
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
Afrique du Nord	Fréquent	Fréquent	—	Prédominant
Afrique occidentale	Prédominant	Peu fréquent	Fréquent	Très rare
Afrique centrale	Prédominant	Fréquent	Rare	Très rare
Afrique orientale	Prédominant	Fréquent	Rare	Rare
Madagascar, O. Indien	Prédominant	Fréquent	Rare	Peu fréquent
Amérique centrale	Fréquent	Rare	—	Fréquent
Amérique du Sud	Fréquent	Rare	—	Prédominant
Asie du Sud-ouest	Fréquent	Peu fréquent	—	Prédominant
De l'Inde à l'Indochine	Prédominant	Peu fréquent	—	Fréquent
Indonésie	Prédominant	Peu fréquent	Rare	Fréquent
Iles du Pacifique	Fréquent	Peu fréquent	Rare	Fréquent

IDENTIFICATION DES 4 ESPÈCES DE PARASITES

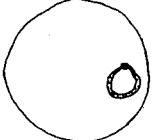
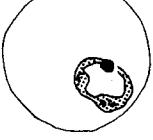
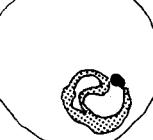
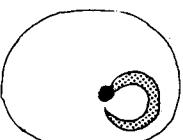
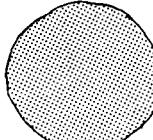
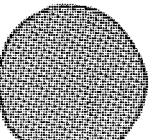
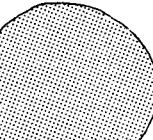
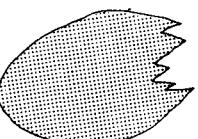
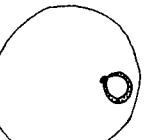
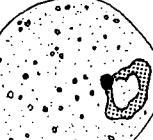
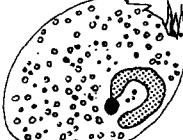
	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>		<i>PLASMODIUM MALARIAE</i>	
TROPHOZOÏTE JEUNE	(Stade fréquent) <i>Cytoplasme</i> : petit anneau fin, bleu pâle, sans granulations <i>Chromatine</i> : 1 ou 2 petits grains rouges		(Stade fréquent) <i>Cytoplasme</i> : anneau bleu soutenu épais, avec quelques grains de pigment noirs <i>Chromatine</i> : 1 grosse tache rouge	
TROPHOZOÏTE ADULTE	(Stade fréquent) <i>Cytoplasme</i> : anneau bleu soutenu épais, ou aspect en virgule, ou en point d'exclamation <i>Chromatine</i> : 1 ou 2 grains rouges, de taille moyenne		(Stade fréquent) <i>Cytoplasme</i> : soit (1) tache compacte, arrondie, bleu foncé, avec nombreux grains de pigment noirs, soit (2) disposé en bande (étalements minces seulement) <i>Chromatine</i> : tache ronde ou bande rouge	
SCHIZONTE	(Très rare) Pratiquement jamais trouvés dans les étalements de sang (sauf dans les cas très graves) <i>Mérozoïtes</i> : 18 à 32 <i>Pigment</i> : brun foncé ou noir		(Stade assez fréquent) <i>Mérozoïtes</i> : 8 à 10 Chacun est une grosse tache rouge, entourée d'un peu de cytoplasme pâle. Ils peuvent avoir une disposition irrégulière (forme jeune) ou être disposés en couronne (forme adulte)	
GAMÉTOCYTE	(Stade assez fréquent) <i>Forme</i> : banane, croissant ou faux <i>Couleur</i> : bleu (mâle) ou bleu soutenu (femelle) <i>Noyau</i> : rose-rouge <i>Pigment</i> : quelques grains bleu-noir situés au centre du cytoplasme, ou dispersés		(Stade assez fréquent) <i>Forme</i> : grand, ovale ou arrondi <i>Couleur</i> : bleu soutenu (femelle) ou clair (mâle) <i>Noyau</i> : 1 tache ronde de chromatine rouge contre un bord <i>Pigment</i> : gros grains noirs dans le cytoplasme	
HÉMATIE	Taille normale Peuvent comporter des cellules crénelées contenant des trophozoïtes adultes. Contiennent souvent quelques grains rouges de taille et de forme irrégulières		Taille et forme normales En général, pas de grains rouges visibles	
* DENSITÉ PARASITAIRE	Souvent très élevée		Faible	

* La densité parasitaire dans une région donnée dépend essentiellement du type de maladie (saisonnière ou endémique). Les adultes surtout acquièrent une certaine immunité dans les zones d'endémicité et la densité parasitaire y est souvent faible.

DU PALUDISME DANS LES ÉTALEMENTS DE SANG

	<i>PLASMODIUM VIVAX</i>	<i>PLASMODIUM OVALE</i>	L'identité de <i>Plasmodium ovale</i> doit être confirmée par l'examen d'un
TROPHOZOÏTE JEUNE	<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: anneau bleu assez gros, à contour irrégulier</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 grain rouge, assez gros</p>		<p><i>Cytoplasme</i>: anneau régulier, bleu soutenu</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 grain rouge de taille moyenne</p> 
TROPHOZOÏTE ADULTE	<p>(Stade peu fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: large tache bleue, irrégulière (quelquefois divisée en 2, 3 ou 4); petits grains de pigment brun-orange</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 tache rouge</p>		<p><i>Cytoplasme</i>: tache ronde compacte, très bleue avec quelques grains de pigment bruns</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 grosse tache rouge</p> 
SCHIZONTE	<p>(Stade assez fréquent)</p> <p><i>Mérozoïtes</i>: 12 à 18 gros grains rouges compacts, posés sur le cytoplasme bleu pâle</p>		<p><i>Mérozoïtes</i>: 8 à 14 grosses taches rouges en couronne, autour d'un amas central de grains de pigment bruns.</p> 
GAMÉTOCYTE	<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Femelle</i>: ovale ou arrondi, bleu soutenu</p> <p>Noyau triangulaire rouge soutenu, souvent placé à une extrémité; nombreux grains de pigment orange dans le cytoplasme.</p> <p><i>Male</i>: arrondi, bleu clair</p> <p>Noyau central rond, rouge clair; quelques grains de pigment orange dans le cytoplasme</p>		<p>Forme: grand, ovale ou arrondi, bleu soutenu</p> <p>Noyau: 1 tache ronde rouge</p> <p>Pigment: quelques grains bruns dans le cytoplasme</p> <p>Different:</p> <ul style="list-style-type: none"> – de <i>P. vivax</i> par son pigment brun – de <i>P. malariae</i> par la présence de granulations de Schüffner 
HÉMATIE	Grosses granulations de Schüffner, souvent colorées en rose, surtout autour des trophozoïtes adultes		<p>Peut paraître ovale, avec extrémités irrégulières</p> <p>Grosses granulations de James, rouges, facilement visibles</p> 
DENSITÉ PARASITAIRE	Moyenne		Moyenne 

COMPARAISON DES HÉMATIES PARASITÉES DANS UN ÉTALEMENT MINCE

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
TAILLE du trophozoïte jeune par rapport au diamètre d'une hématie (au même stade de développement)				
	1/5 à 1/3 du diamètre	1/4 à 2/3 du diamètre, mais souvent en forme de bande	1/4 à 2/3 du diamètre	1/4 à 2/3 du diamètre
ASPECT de l'hématie parasitée				
	Reste inchangée	Inchangée ou devenue plus petite et, parfois, plus colorée	Agrandie et souvent de coloration pâle	Agrandie, ovale, avec des bords déchirés, dentelés
GRANULATIONS dans l'hématie parasitée				
	Souvent aucune*	Aucune	Souvent semis de fines granulations roses de Schüffner	Toujours de grosses granulations de James
STADES rencontrés	Trophozoïtes ou gamétocytes, ou ces deux formes ensemble; on peut trouver de nombreux trophozoïtes dans une seule hématie	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame

A NOTER:

Aspect des monocytes (dans les cas de paludisme de longue durée):

- le cytoplasme contient souvent des masses brunes ou vert noirâtre (corps sidérophiles).

Aspect des parasites après une injection de médicament antipaludique:

- les parasites se colorent mal. Ils sont altérés et ont un aspect flou.

* Dans certaines hématies parasitées par des trophozoïtes adultes de *P. falciparum* on peut trouver des granulations roses assez grosses dites "taches de Maurer".

NOTATION DES RÉSULTATS

Résultat positif

Préciser:

1. l'espèce de parasite observé
2. son stade de développement
3. la densité parasitaire*.

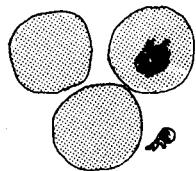
Exemple

Recherche positive.

- *Plasmodium falciparum*
- nombreux trophozoïtes
- quelques gamétocytes.

Résultat négatif

Indiquer: Recherche des parasites négative.



Attention: Ne pas prendre pour un parasite du paludisme une plaquette sanguine superposée à une hématie. (Plaquettes sanguines, voir page 351).

* Quand les parasites sont très nombreux (densité parasitaire très élevée), le malade a besoin d'un traitement d'urgence. Si l'on constate une densité parasitaire élevée, il faut donc l'indiquer clairement dans le rapport, que l'on communiquera sans délai au médecin.

22. Microfilaires sanguines : recherche à l'état frais, concentration

Principe

Sang capillaire

Mélanger 1 goutte de sang capillaire du doigt à du soluté physiologique, placer entre lame et lamelle et examiner au microscope pour y rechercher les microfilaires mobiles.

Sang veineux

On peut aussi rechercher les microfilaires par concentration de sang veineux.

A. EXAMEN DU SANG CAPILLAIRE

Choisir la bonne période de la journée.

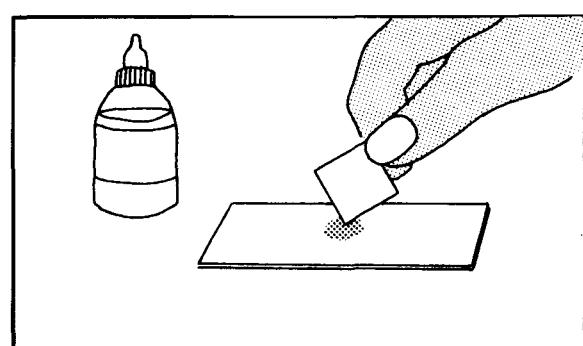
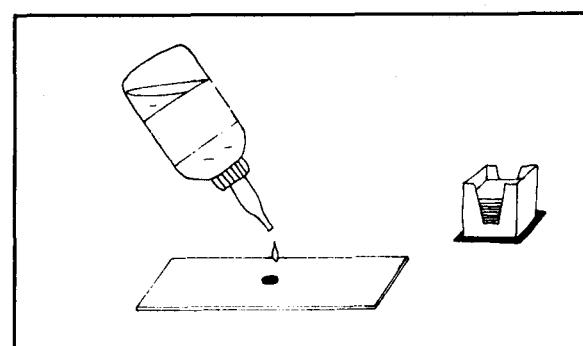
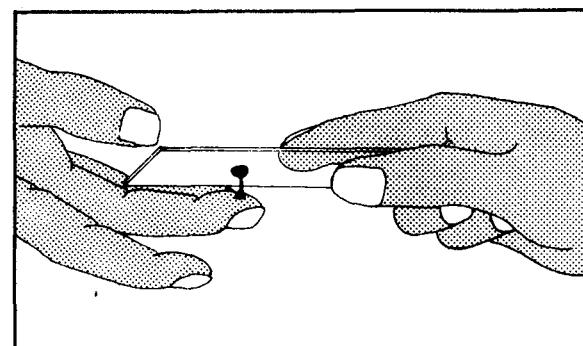
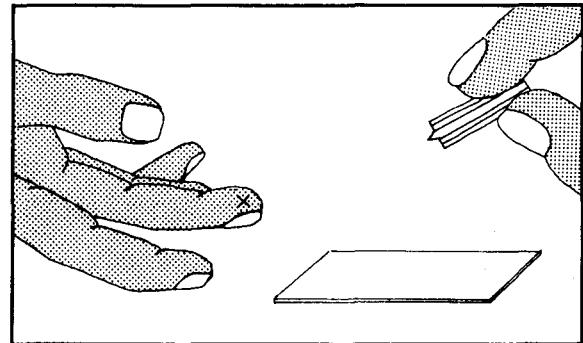
Certaines microfilaires n'apparaissent dans le sang que la nuit, d'autres le jour seulement.

Espèce	Quand effectuer le prélèvement*	Région du monde
<i>W. bancrofti</i>	La nuit (entre 22 h et 4 h)	Afrique tropicale, Asie, Amérique centrale et du Sud, Océan Indien
<i>W. bancrofti</i> (var. <i>pacifica</i>)	A n'importe quel moment	Océan Pacifique
<i>B. malayi</i>	Surtout la nuit (entre 22 h et 4 h)	Asie
<i>Loa loa</i>	Le jour (entre 10 h et 16 h)	Afrique occidentale et centrale
<i>Filiaires de pathogénicité douteuse:</i> — <i>D. perstans</i> — <i>M. ozzardi</i>	A n'importe quel moment A n'importe quel moment	Afrique tropicale Amérique tropicale

* Ces périodicités peuvent varier.

Matériel

- Vaccinostyle
- Tampons d'ouate
- Lame
- Lamelle
- Soluté physiologique (réactif No. 47)



Méthode

1. Désinfecter à l'alcool le doigt à piquer. Choisir le 3ème doigt (majeur). Bien le sécher. Piquer avec un vaccinostyle.

2. Récolter la *première goutte* qui s'écoule (c'est celle qui contient le plus de microfilaires), directement au centre de la lame.

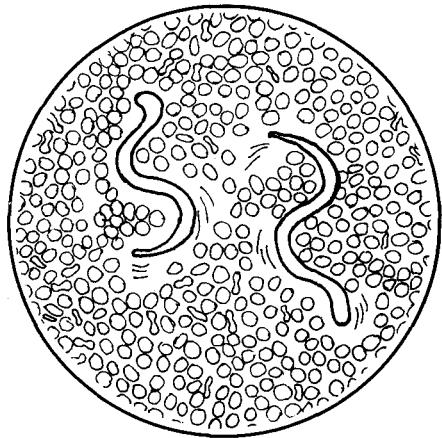
3. Ajouter sur la goutte de sang 1 goutte de soluté physiologique de volume égal.

4. Mélanger le sang et le soluté physiologique avec le coin d'une lamelle. Recouvrir avec la lamelle.

5. Sur une autre lame, confectionner 2 gouttes épaisses avec 2 autres gouttes de sang pour l'identification des microfilaires colorées (voir page 189).

Examiner systématiquement la lame de sang frais au microscope (objectif 10 x, avec ouverture réduite du condenseur).

La présence d'une microfilarie se remarque d'abord par un mouvement rapide dans les hématies.

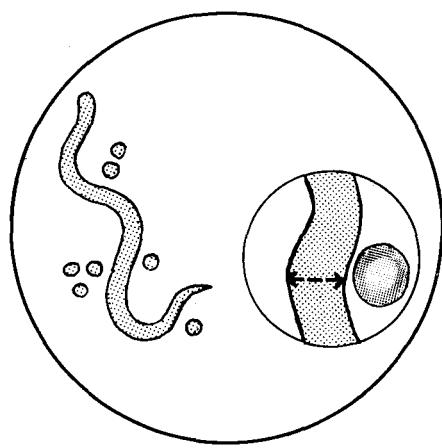


Microfilaires présentes dans les étalements de sang à l'état frais

L'identification des microfilaires se fait sur les étalements de sang colorés. Toutefois, par observation à l'état frais, on peut déjà se faire une idée :

- du type d'espèce observée et de sa pathogénicité.

Pathogènes

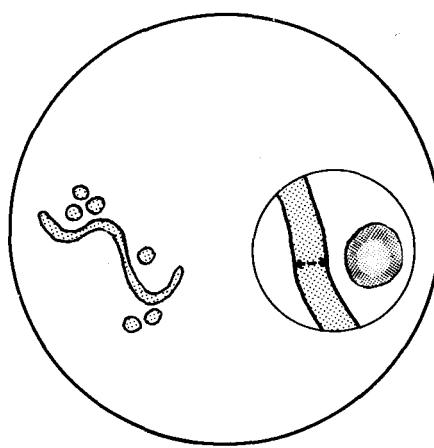


Epaisseur: généralement 6 à 8 µm
(diamètre d'une hématie)

Longueur: généralement 250 à 300 µm
(ici la ½ du champ)

W. bancrofti, Loa loa, B. malayi

Pathogénicité douteuse



Epaisseur: généralement 4 µm
(la ½ du diamètre d'une hématie)

Longueur: généralement 150 µm
(ici le ¼ du champ)

D. perstans, M. ozzardi

6. Identifier l'espèce de microfilaires en colorant la préparation (voir page 209).

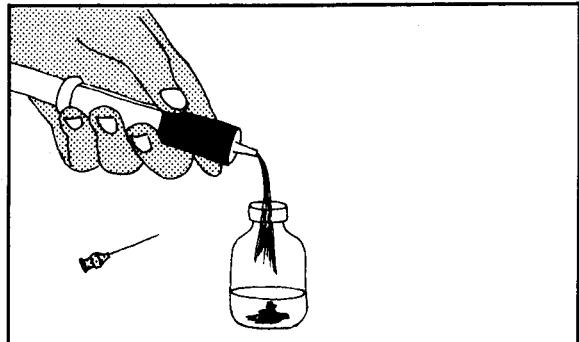
B. RECHERCHE DANS UNE CONCENTRATION DE SANG VEINEUX, APRÈS HÉMOLYSE

Matériel

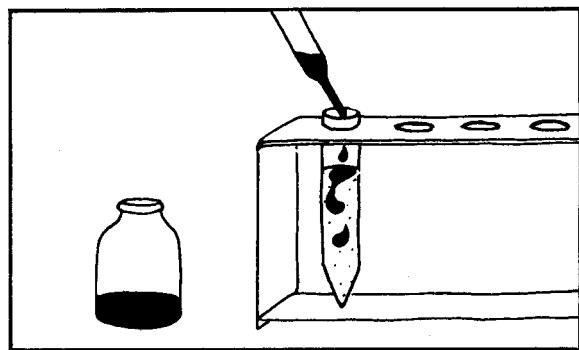
- Seringue de 5 ml
- Aiguilles pour ponction veineuse
- Anticoagulant: solution de citrate trisodique à 2%. (réactif No. 16)
- Formol à 2%
- Centrifugeur
- Tubes coniques à centrifuger.

Méthode

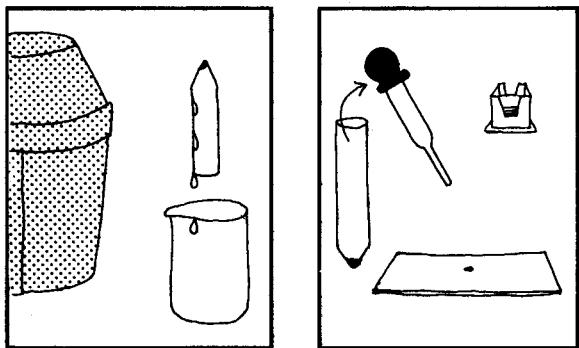
1. Recueillir 4 ml de sang veineux.
Les verser immédiatement dans un flacon contenant
1 ml de solution citratée.
Mélanger.



2. Dans un tube conique à centrifuger mesurer:
 - 10 ml de formol à 2%Ajouter:
 - 1 ml de sang citraté.Mélanger. Attendre 5 minutes que les hématies soient hémolysées.



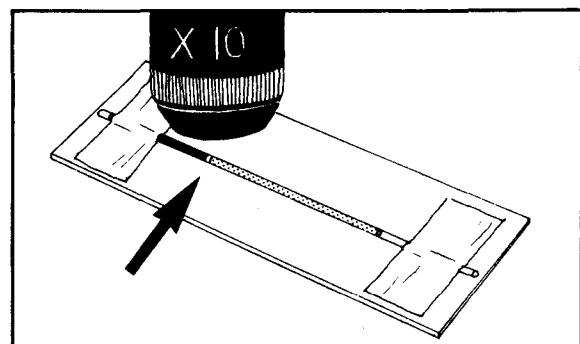
3. Centrifuger 5 minutes à grande vitesse.
Rejeter le surnageant.
Tapoter le tube pour mélanger le culot.
4. Placer 1 goutte de culot sur une lame.
Etaler de manière à former un étalement mince.
Laisser sécher à l'air.
Fixer avec un mélange d'alcool et d'éther en parties égales.
Laisser sécher 2 minutes.
Colorer immédiatement au Giemsa (voir page 193).
Les microfilaires se colorent bien (pour leur identification voir pages 212 et 213).



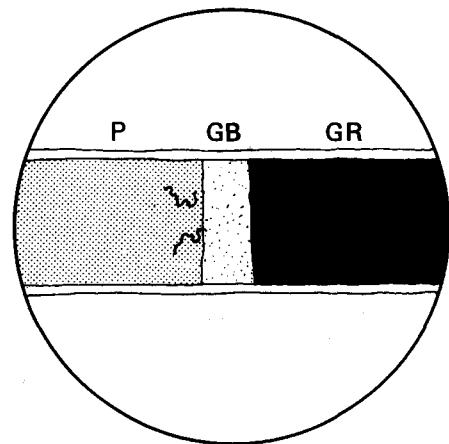
C. TECHNIQUE FAISANT APPEL À UN CENTRIFUGEUR POUR MICRO-HEMATOCRITE

Recueillir le sang veineux du malade sur citrate, comme indiqué ci-dessus, ou prélever 2 gouttes de sang capillaire du doigt et les mélanger à 1 goutte de citrate trisodique à 2%.

1. Remplir aux 3/4 un tube capillaire pour micro-hématocrite avec le sang citraté. Sceller une extrémité du tube à la cire molle ou à la chaleur.
2. Centrifuger à grande vitesse au centrifugeur pour micro-hématocrite pendant 2 minutes.
3. Poser le tube capillaire sur une lame et l'y fixer par ses 2 extrémités avec du papier adhésif.



Examiner au microscope (objectif 10 x et ouverture réduite du condenseur) la zone de séparation entre hématies et plasma.



Les microfilaires mobiles sont visibles à la base de la couche de plasma, juste au-dessus de la couche de leucocytes.

On peut casser le tube à ce stade et utiliser la 1ère goutte de chaque section brisée pour faire une goutte épaisse. Colorer au Giemsa pour identifier l'espèce de microfilarie.

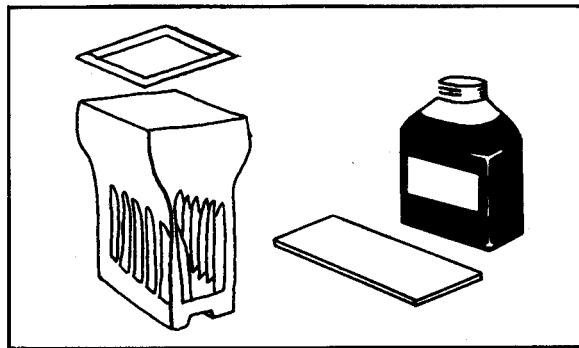
23. Microfilaires sanguines : coloration et identification

Principe

Pour identifier avec certitude les microfilaires sanguines, il est nécessaire de les colorer.

MATÉRIEL – RÉACTIF

- Vaccinostyles
- Lames
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Cuve à coloration
- Compte-gouttes
- Béchers
- Eprouvette graduée de 10 ml
- Colorant de Giemsa.



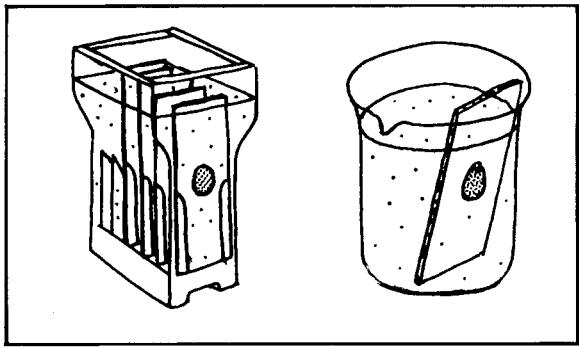
A. GOUTTE ÉPAISSE

Prélever 1 goutte de sang capillaire au moment favorable (voir tableau page 204).

Préparer une goutte épaisse comme indiqué page 189).

B. DÉSHÉMOGLOBINISATION

- (a) Placer les lames en position verticale dans une cuve à coloration remplie de soluté physiologique (ou, à défaut, dans un bêcher).
- (b) Attendre 10 minutes (l'hémoglobine tombe peu à peu au fond).
- (c) Sortir les lames et les égoutter.

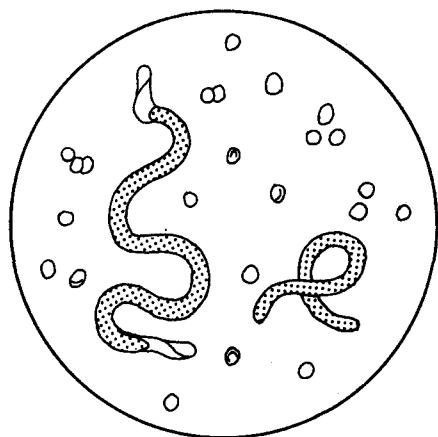


C. COLORATION AU GIEMSA

Colorer pendant 30 minutes en utilisant une dilution de Giemsa de 1 pour 10, comme il est dit à la page 193.

D. EXAMEN MICROSCOPIQUE

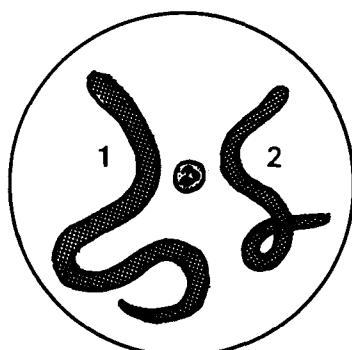
- (a) Recouvrir l'étalement coloré d'une fine couche d'huile à immersion.
 - (b) Chercher les microfilaires à l'objectif 10 x: elles doivent être aisément visibles;
 - (c) Examiner les microfilaires trouvées à l'objectif 100 x à immersion.
-



E. IDENTIFICATION: QUELQUES CARACTÉRISTIQUES UTILES

Etudier par ordre d'importance:

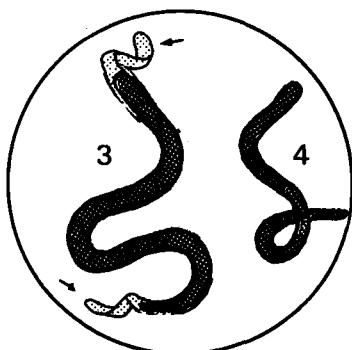
- (a) *La taille de la microfilarie*:
 - sa longueur (par rapport au champ)
 - son épaisseur (par rapport aux leucocytes)
 - aussi épaisse qu'1 leucocyte (1)
 - aussi épaisse qu'½ leucocyte (2).
-



- (b) *La gaine de la microfilarie*

Elle est présente (3) ou absente (4). Selon les espèces, les gaines peuvent être colorées en rose pâle par le Giemsa ou rester incolores.

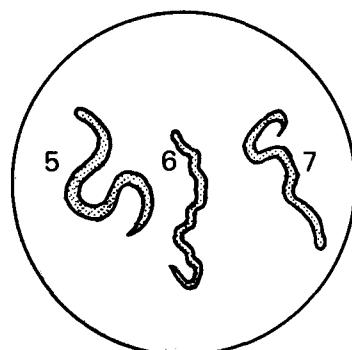
(Attention: Les gaines sont quelquefois déchirées et difficiles à voir. L'identification ne saurait donc dépendre de cette seule caractéristique.)

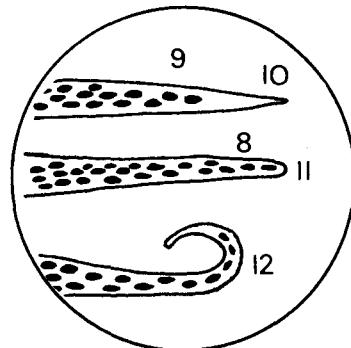


- (c) *Les courbures de la microfilarie*

Il y a plusieurs types de courbures:

- courbures amples (5)
- nombreuses petites courbures (6)
- courbures petites et peu nombreuses (7).

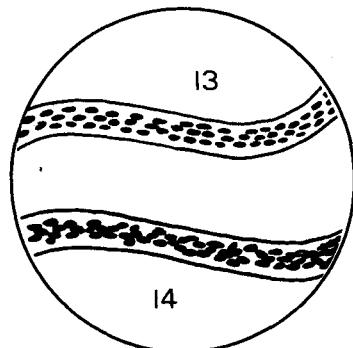




(d) *La queue de la microfilarie et ses noyaux*

On pourra remarquer les éléments suivants:

- présence de noyaux jusqu'au bout (8) ou non (9)
- queue effilée (10)
- queue arrondie (11)
- queue incurvée (12).

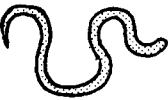
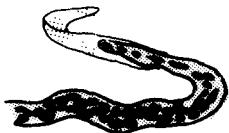


(e) *Les noyaux du corps*

Ils sont colorés en violet foncé par le Giemsa. Ils peuvent être:

- bien séparés (13)
- se chevauchant (14).

IDENTIFICATION DES MICROFILAIRES COLORÉES PAR LE GIEMSA

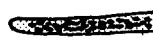
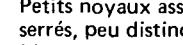
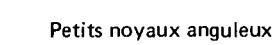
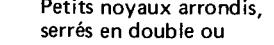
	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Loa loa</i>
Où	Afrique tropicale Asie Amérique tropicale Océan Indien Océan Pacifique	Afrique centrale Afrique occidentale (du Nigéria au Gabon)
Quand?	La nuit*	Le jour
Longueur	200-300 µm	250-300 µm
Epaisseur	8 µm (1 leucocyte environ**) 	8 µm (1 leucocyte environ) 
Gaine	Gaine rose 	Gaine presque incolore 
Courbures du corps	Régulières, grandes 	Irrégulières, petites 
Queue	Pas de noyau au bout***  Queue assez rectiligne et effilée	Noyaux jusqu'au bout  Queue incurvée, effilée
Noyaux du corps	Noyaux moyens, arrondis, bien séparés	Gros noyaux arrondis, serrés, se chevauchant

*Sauf var. *pacifica*: à toute heure.

**Sur les gouttes épaisses, les leucocytes, toujours contractés, mesurent 8 à 11 µm.

***La queue peut quelquefois être cassée ou repliée, on croira voir alors, à tort, des noyaux jusqu'au bout.

COLORÉES PAR LE GIEMSA

<i>Dipetalonema perstans</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>
Afrique tropicale Amérique du Sud	Asie	Amérique centrale Amérique du Sud
A toute heure	La nuit, surtout	A toute heure
150-200 µm	220-250 µm	150-200 µm
4 µm (½ leucocyte) 	6 µm (presque 1 leucocyte) 	4 µm (½ leucocyte) 
Pas de gaine 	Gaine très rose 	Pas de gaine 
Régulières, aspect de boucle de ficelle 	Petites, nombreuses, irrégulières 	Petites et peu nombreuses 
Double rangée de noyaux jusqu'au bout 	2 noyaux espacés vers le bout de la queue 	Une rangée de noyaux presque jusqu'au bout 
Queue rectiligne, à bout arrondi 	Queue incurvée, très effilée 	Queue rectiligne, effilée 
Petits noyaux assez serrés, peu distincts (donnant un aspect de tresse) 	Petits noyaux anguleux, serrés et peu distincts 	Petits noyaux arrondis, serrés en double ou triple file 

RECOMMANDATIONS POUR L'IDENTIFICATION DES MICROFILAIRES

Cette identification peut souvent être délicate et l'expérience montre que les erreurs sont fréquentes. Cependant, en passant systématiquement en revue *toutes les caractéristiques mentionnées*, on doit parvenir à identifier avec certitude l'espèce observée. Il ne faut pas s'en tenir à une seule caractéristique, mais juger par rapport à leur ensemble.

Exemples d'erreurs

1. Queue

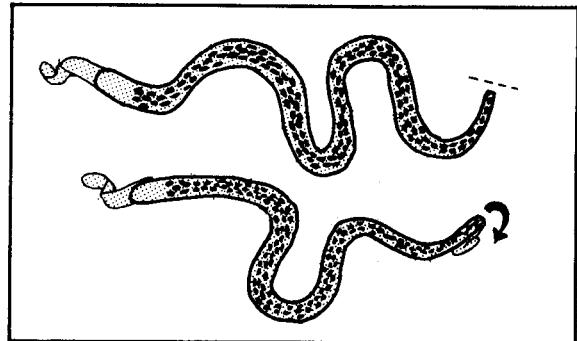
Si la queue d'une *W. bancrofti* est cassée ou repliée, on croira voir des noyaux jusqu'au bout, comme pour une *Loa loa*.

2. Gaine

Elle est parfois arrachée ou presque décolorée. Chez *Loa loa* par exemple, on ne remarque qu'une zone incolore entre la queue et les globules.

3. Taille

Certaines *D. perstans* sont très longues (200 µm); certaines *W. bancrofti* et *Loa loa* sont petites (250 µm).



4. Courbures

Si elles sont malmenées lors de la préparation d'une goutte épaisse, certaines *W. bancrofti* peuvent paraître un peu tordues, alors que des *Loa loa* peuvent au contraire avoir quelques courbures.

5. Origine géographique

Toujours tenir compte de l'origine du malade.
S'il s'agit:

- d'un habitant du bassin du Zaïre, du Nigéria oriental ou du Cameroun, on soupçonnera plutôt *Loa loa*
- d'un Sénégalais, d'un Ghanéen, d'un Antillais ou d'un Indien, c'est probablement *W. bancrofti* qui est en cause
- d'un Thaïlandais, le parasite est vraisemblablement *B. malayi*
- d'un Guyanais, c'est probablement à *M. ozzardi* que l'on a affaire.

6. Étalements minces

L'identification des microfilariae dans les étalements minces colorés n'est pas conseillée; les microfilariae y sont rétractées, déformées et difficiles à identifier.

24. Onchocercose : recherche des microfilaries cutanées

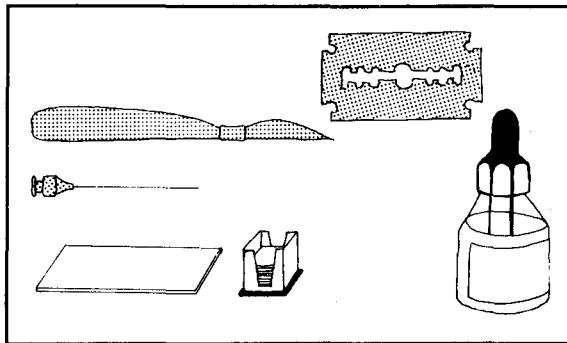
L'onchocercose est une maladie parasitaire due au ver *Onchocerca volvulus*. Les vers mâles et femelles vivent dans les tissus sous-cutanés de l'homme, massés dans des nodules. Les vers femelles pondent des larves (les microfilaries) qui migrent sous la peau. L'onchocercose sévit dans toute l'Afrique tropicale, ainsi que dans une partie de l'Arabie, de l'Amérique centrale et de l'Amérique du Sud. Elle est transmise par une petite mouche noire, la *Simulium*.

Examen de laboratoire

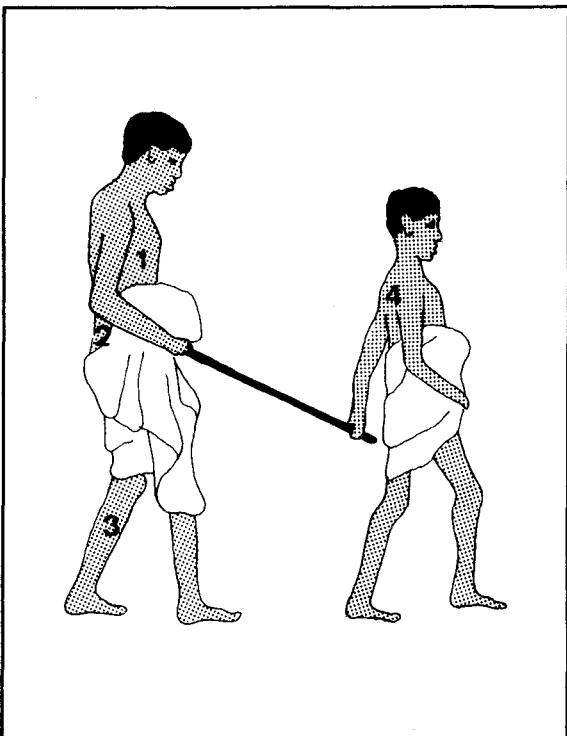
On prélève un très petit fragment de peau du malade. On l'examine au microscope à l'état frais entre lame et lamelle, pour y observer les microfilaries très mobiles.

MATÉRIEL

- Aiguille (22 G (0,7 mm) x 40 mm pour injection intra-musculaire ou 22 G x 25 mm pour injection sous-cutanée)
- Bistouri ou lame de rasoir
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Lames, lamelles
- Alcool.



Note: Le prélèvement de peau est facilité par l'utilisation de la pince emporte-pièce de Walser-Toufic, diamètre 2,5 mm.



OÙ EFFECTUER LE PRÉLÈVEMENT

(a) *Malades présentant des nodules*

Rechercher les nodules:

- sur le flanc (au niveau des côtes)
- à la hanche
- sur les jambes (tibia)
- dans le dos (omoplates)

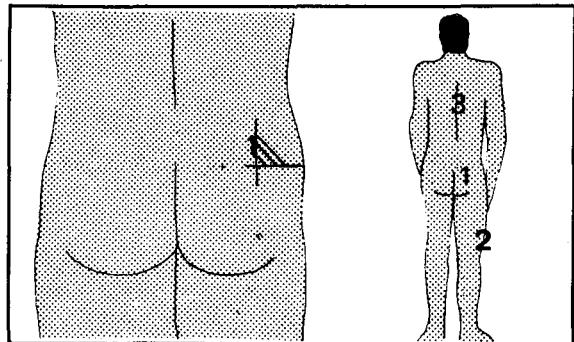
Les nodules sont des masses rondes et dures, de 1 à 5 cm de diamètre; ils glissent sous la peau quand on les palpe. Prélever la peau au centre du nodule.

(b) *Malades ne présentant pas de nodules*

Prélever la peau:

- en haut de la fesse (partie supérieure externe, réservée aussi aux injections intramusculaires).
- Si la recherche est négative, prélever ensuite:
 - au mollet (partie supérieure externe)
 - dans le dos, au centre de l'omoplate.

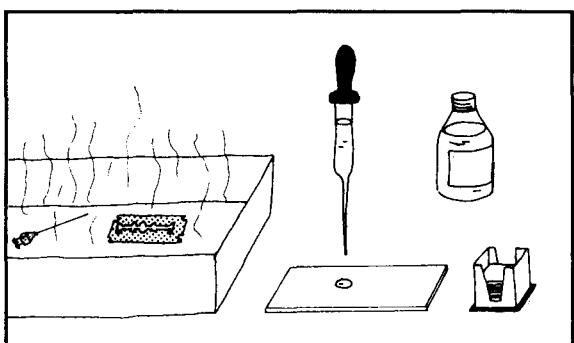
On conseille de faire 6 prélèvements, 2 aux fesses, 2 aux mollets, 2 aux omoplates avant de conclure à une recherche négative.



PRÉLÈVEMENT

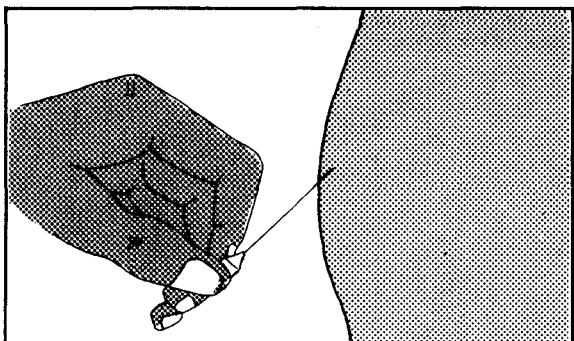
(a) *Préparation*

1. Flamber à l'alcool le bistouri (ou la lame de rasoir) et l'aiguille.
2. Déposer 1 goutte de soluté physiologique sur une lame.
3. Désinfecter la région choisie à l'aide d'une compresse de gaze trempée dans l'alcool.

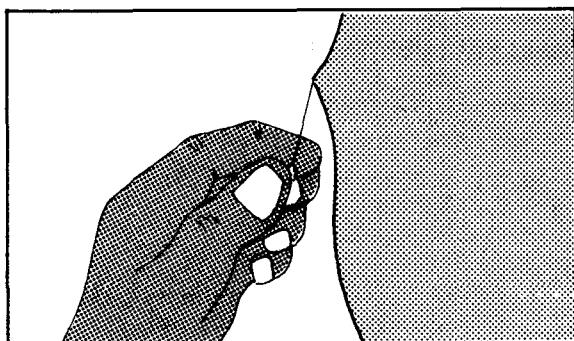


(b) *Méthode*

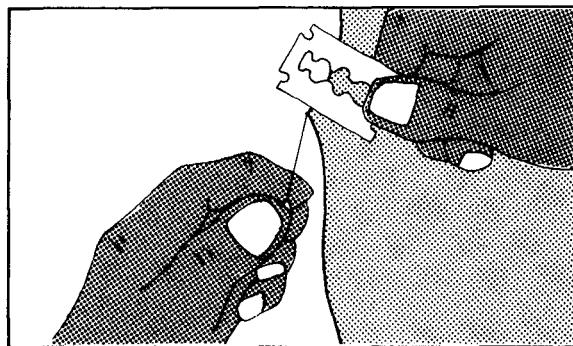
1. Avec la main gauche, enfoncez la pointe de l'aiguille sous l'épiderme de 2 à 3 mm seulement.



2. Tirer la peau avec la pointe de l'aiguille.

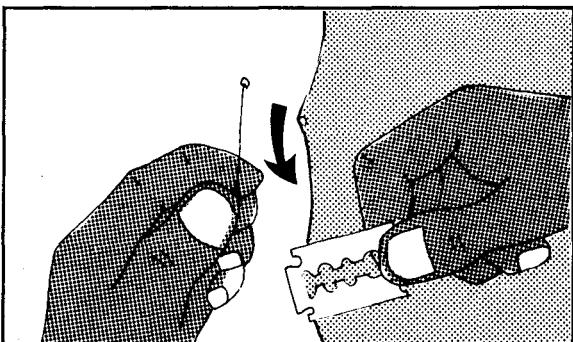


3. Avec la main droite, placer la lame du bistouri ou la lame de rasoir au-dessus de la pointe de l'aiguille sur la peau tirée.

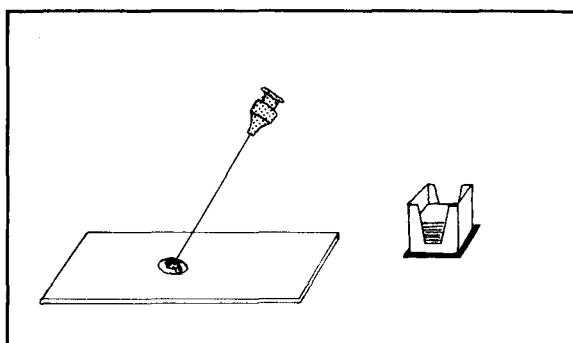


4. Couper d'un coup sec le morceau de peau tirée le plus près possible de la pointe de l'aiguille. Le morceau prélevé doit avoir environ cette taille: ● (2 à 3 mm)

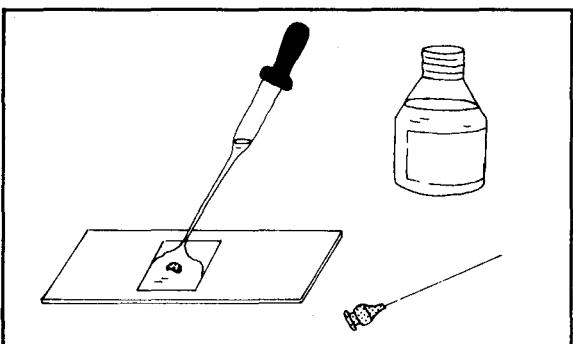
Il doit rester fixé à la pointe de l'aiguille. Il ne doit pas être souillé de sang: on dit que la biopsie doit être exsangue.



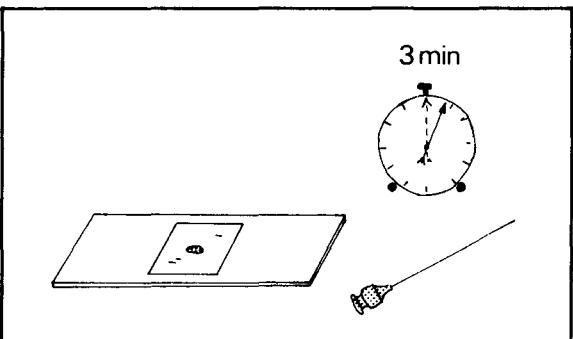
5. Placer le morceau de peau coupée dans la goutte de soluté physiologique, sur la lame (en s'aistant au besoin de la lame de rasoir ou du bistouri). Ne pas aplatisir le morceau de peau; s'il n'y avait qu'une seule microfilarie, elle risquerait d'être abîmée.



6. Recouvrir d'une lamelle. Si toute la peau ne baigne pas dans le soluté physiologique, en rajouter sous la lamelle à l'aide d'une pipette Pasteur, jusqu'à ce que toute la surface de la lamelle soit humide.



7. Attendre 2 à 3 minutes. Pendant ce temps, nettoyer à l'alcool l'endroit où a été opéré le prélèvement. Recouvrir d'un pansement adhésif.



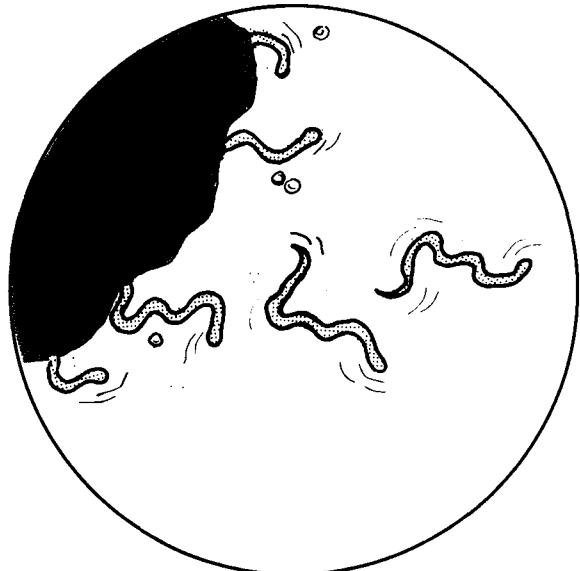
EXAMEN MICROSCOPIQUE

Utiliser l'objectif 10 x, avec ouverture réduite du condenseur. Examiner les contours du morceau de peau. Les microfilaires en sortent, attirées par le liquide. Elles sont très mobiles.

Longueur	200 à 300 µm
Largeur	8 µm (1 hématie)
Courbure du corps	assez anguleuse
Extrémité avant	un peu élargie
Queue	effilée et recourbée.

Si le prélèvement contient très peu de microfilaires, attendre 10 minutes.

Si on ne voit pas sortir de microfilaires, examiner aussi l'intérieur du morceau de peau: par transparence, on pourra y voir se mouvoir une microfilarie.

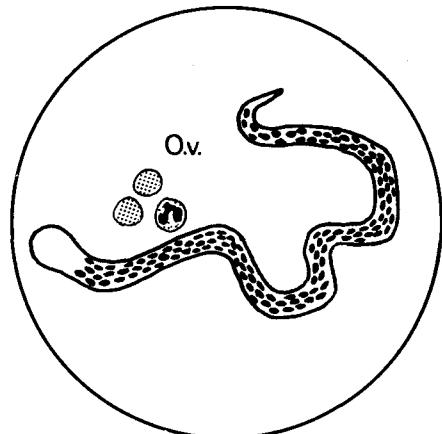


MÉTHODE À EMPLOYER POUR LA COLORATION

Faire un frottis sur la lame en écrasant un prélèvement cutané. Le fixer au méthanol et le colorer au Giemsa (voir page 193).

Les microfilaires d'*Onchocerca volvulus* présentent les caractéristiques suivantes:

- pas de gaine
- extrémité avant élargie
- courbures rigides
- queue amincie graduellement et brusquement incurvée
- gros noyaux ovales, allongés et colorés en bleu-noir; ils sont bien séparés et ne vont pas jusqu'au bout de la queue.

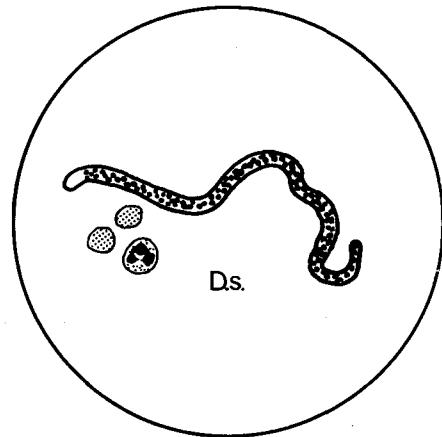


AUTRE MICROFILAIRE TROUVÉE DANS LES BIOPSIES CUTANÉES

Dipetalonema streptocerca

Ce ver assez rare ne serait pas pathogène. Sa microfilarie se trouve parfois dans la peau et présente les caractéristiques suivantes:

- elle est moins large (½ hématie)
- elle est un peu moins longue (200 µm)
- l'extrémité avant n'est pas élargie
- la queue est recourbée en crosse ronde
- les noyaux sont plus petits et vont jusqu'au bout de la queue.



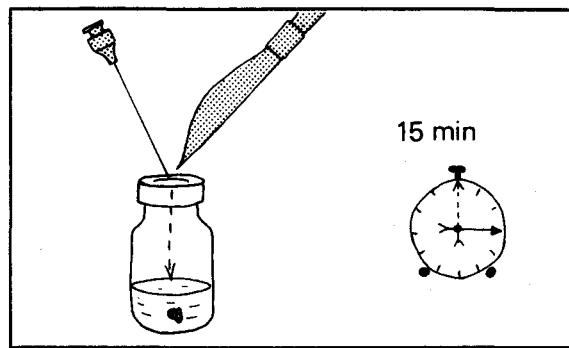
EN CAS DE DOUTE

1. Examiner entre lame et lamelle du sang frais prélevé au bout du doigt, pour y rechercher les microfilaires sanguines (voir page 205).
2. Si cet examen est positif, faire un frottis cutané coloré et une goutte épaisse de sang, également colorée (voir page 193) pour identifier l'espèce.

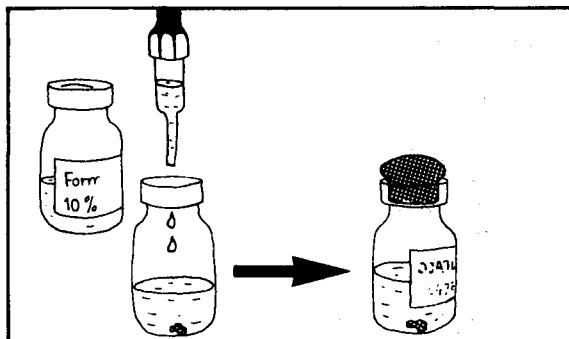
PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS SUR LE TERRAIN

Si on ne dispose pas de microscope ou lors d'enquêtes épidémiologiques de masse:

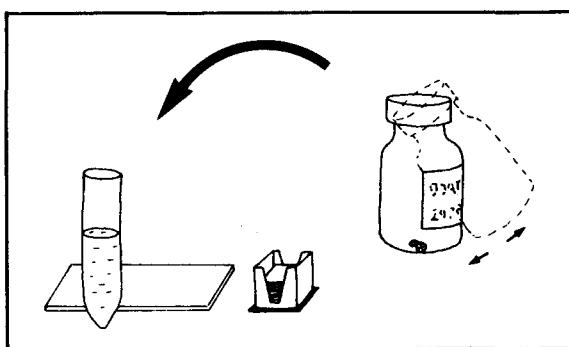
1. Placer le fragment de peau dans un petit flacon de pénicilline contenant 2 ml de soluté physiologique.
2. Attendre 15 minutes que les microfilaries quittent le fragment de peau.



3. Au bout de 15 minutes, fixer en ajoutant 2 ml de formol à 10% (réactif No. 26). Mélanger et boucher le flacon. Conservation: plusieurs mois.

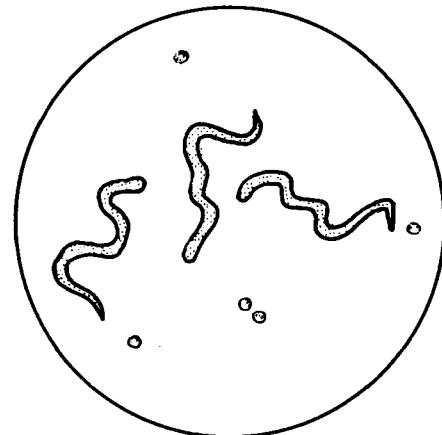


4. Une fois revenu au laboratoire, bien agiter le flacon. Centrifuger le liquide (après avoir retiré le prélèvement de peau) à vitesse moyenne ou au centrifugeur à main.



5. Examiner le culot de centrifugation au microscope, entre lame et lamelle.

Les microfilaries mortes sont bien observables, sans coloration, avec leur courbure anguleuse caractéristique.



MICROFILAIRES DE L'ŒIL

Les microfilaries peuvent parfois migrer dans l'œil, où l'ophtalmologiste pourra les observer à l'aide d'un appareil spécial.

25. Trypanosomes : recherche dans le sang, concentration

Principe

Les trypanosomes sont recherchés dans le sang:

- à l'état frais
- dans des gouttes épaisses, après coloration
- après concentration par centrifugations répétées.

On peut observer la présence de trypanosomes dans le sang de malades atteints:

- de trypanosomiase africaine (maladie du sommeil)
- de trypanosomiase d'Amérique du Sud (maladie de Chagas)

Attention:

Dans la trypanosomiase africaine, les trypanosomes apparaissent périodiquement dans le sang, pendant quelques jours, surtout dans les 3 premiers mois de la maladie, et tout particulièrement pendant les accès de fièvre.

A. EXAMEN DIRECT

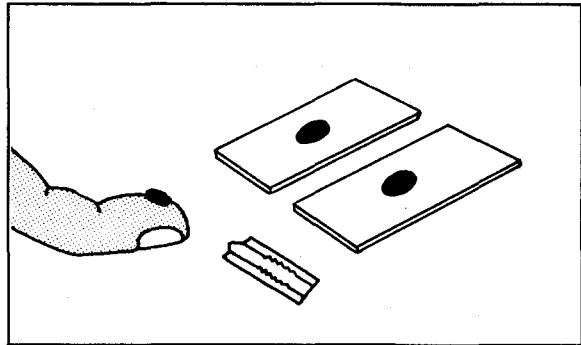
MATÉRIEL

- Vaccinostyle
- Alcool
- Lames
- Lamelles
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Colorant de Giemsa
- Eau tamponnée ou neutre
- Papier-filtre.

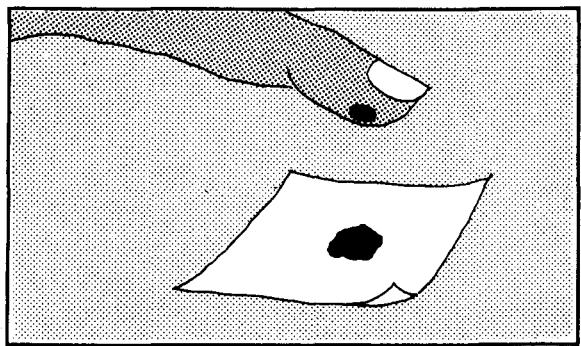
MÉTHODE

1. Après désinfection, piquer avec le vaccinostyle le coussinet du 3ème doigt (majeur). Essuyer la 1ère goutte avec du papier-filtre. Recueillir 2 gouttes de sang:

- 1 goutte sur une lame
- 1 goutte sur une 2ème lame.



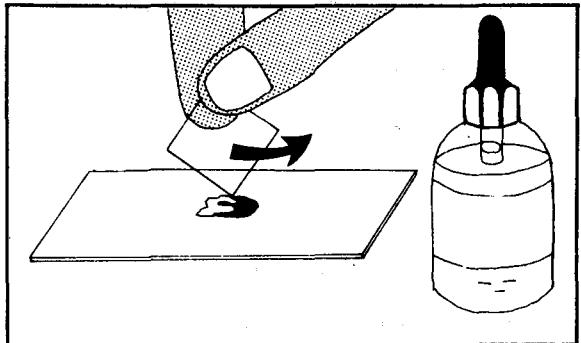
2. Recueillir 2 gouttes de sang sur un morceau de papier-filtre. Laisser sécher.

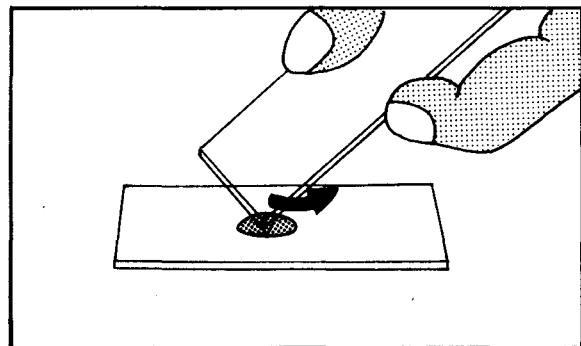


3. Sur la 1ère lame, déposer:

- 1 goutte de soluté physiologique à côté de la goutte de sang

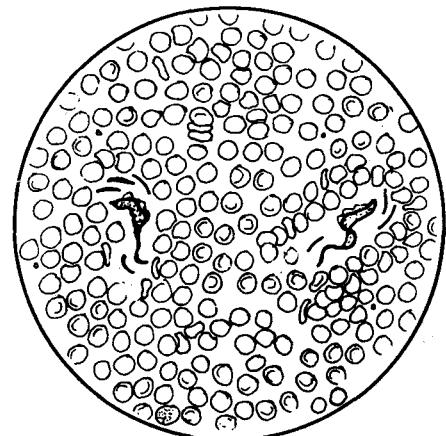
Mélanger avec le coin d'une lamelle. Recouvrir avec la lamelle.





4. Sur l'autre lame:

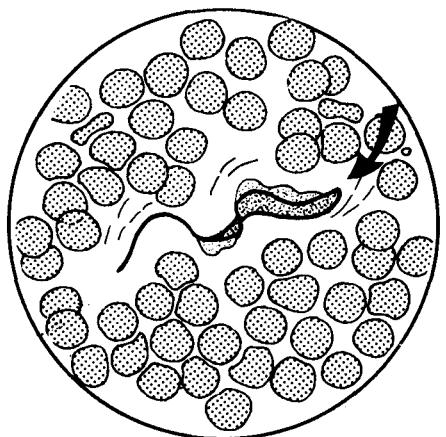
- étaler le sang pour former une goutte épaisse (voir mode opératoire page 189).
-



5. Examiner au microscope la 1ère lame avec le sang frais en utilisant l'objectif 40 x et en réduisant l'ouverture du condenseur.

Examiner en premier lieu les bords de la préparation.

Rechercher un mouvement parmi les hématies; le trypanosome les secoue au passage de son flagelle.



Vérifier qu'il s'agit bien d'un trypanosome:

Longueur 15 à 25 µm (2 à 3 hématies)

Largeur 3 µm ($\frac{1}{2}$ hématie)

Forme celle d'un poisson allongé

Mouvement se meut rapidement, avance et se contracte comme un serpent, possède une *membrane ondulante*, prolongée à l'avant par un flagelle mobile.

Ne pas confondre avec une microfilarie qui est beaucoup plus grande (100 à 300 µm, comme 10 à 40 hématies).

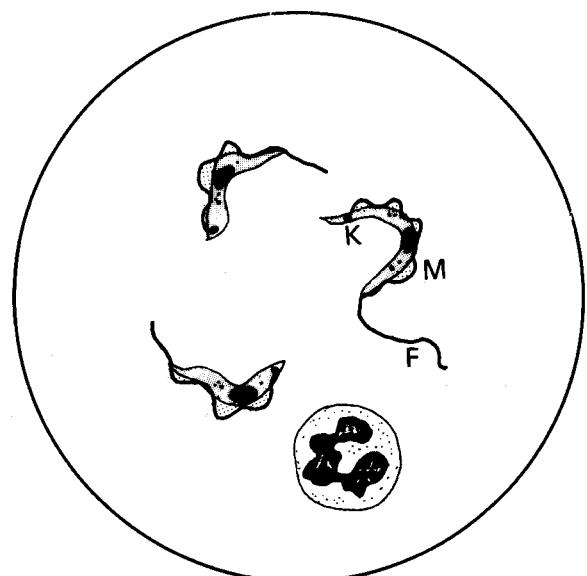
6. Examen des gouttes épaisses

Toujours examiner les gouttes épaisses, même si l'examen à l'état frais semble positif, pour s'assurer que la forme mobile observée est bien un trypanosome. Colorer au Giemsa (voir page 193) ou au colorant de Field (voir page 191).

Description des trypanosomes colorés (*T. gambiense* ou *T. rhodesiense*) *

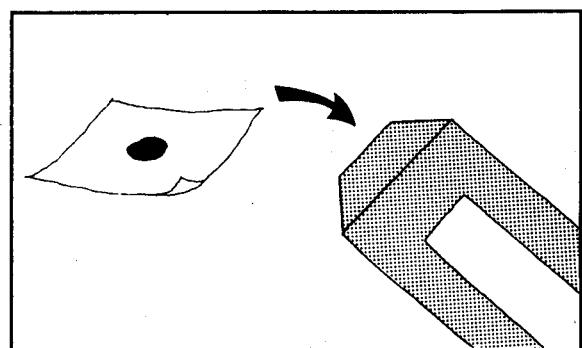
Longueur	15 à 25 µm (1 à 2 leucocytes)
Cytoplasme	bleu pâle
Noyau	gros noyau central, coloré en rouge-violet
Granulations	1 grain compact, rouge, à l'arrière: le kinétoplaste (K)
Membrane ondulante (M)	rose-rouge, part du kinétoplaste
Flagelle (F)	rose, prolonge sur 5 µm la membrane ondulante.

* *T. gambiense* (Afrique occidentale et centrale) et *T. rhodesiense* (Afrique orientale) sont d'aspect identique.



7. Si la recherche est négative:

- répéter les examens pendant 7 jours consécutifs.
- Expédier la goutte de sang séché, sur papier-filtre,
au laboratoire d'immunologie pour la recherche des
immunoglobulines (IgM) et des anticorps FAT.

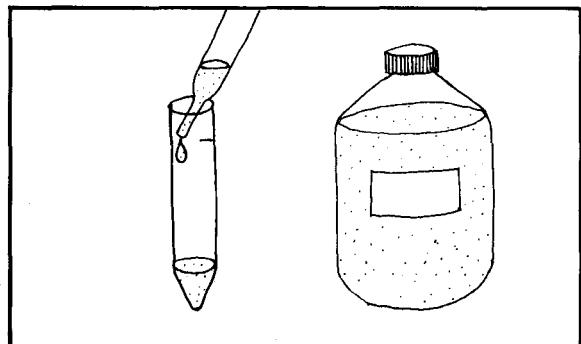


B. MÉTHODE DE CONCENTRATION À PARTIR DE SANG VEINEUX

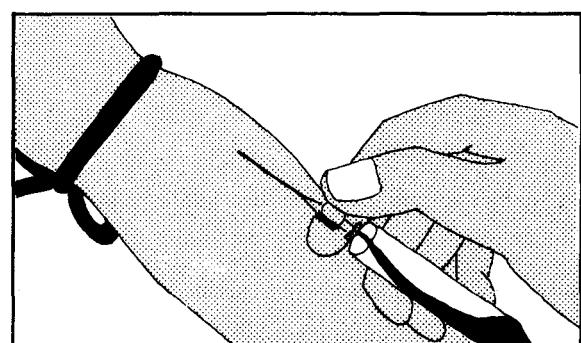
Recherche après triple centrifugation

Matériel

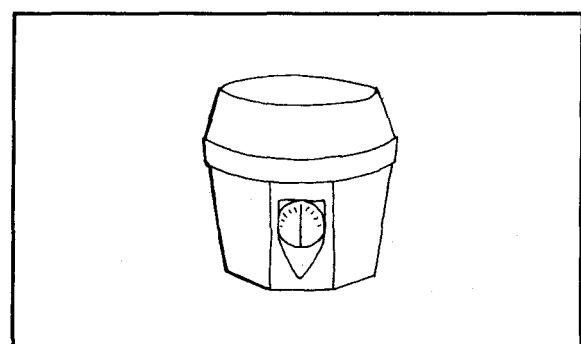
- Centrifugeur électrique
- Tubes coniques à centrifuger
- Pipette Pasteur
- Solution aqueuse de citrate trisodique à 3,8% (réactif No. 17).



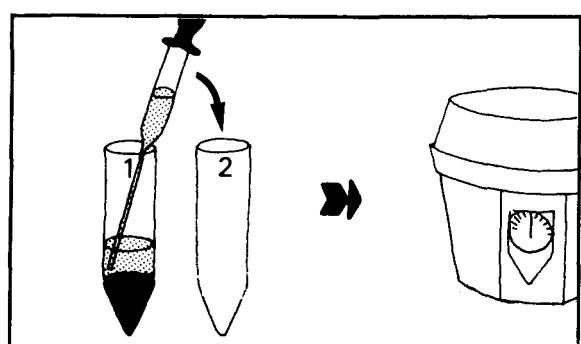
1. Prendre un tube conique à centrifuger avec un trait de jauge pour 10 ml. Y mesurer:
 - 1 ml de solution de citrate.



2. Prélever:
 - 9 ml de sang veineux, et y ajouter le citrate (jusqu'à atteindre le repère 10 ml).



3. Mélanger et centrifuger immédiatement pendant 3 minutes à vitesse moyenne.



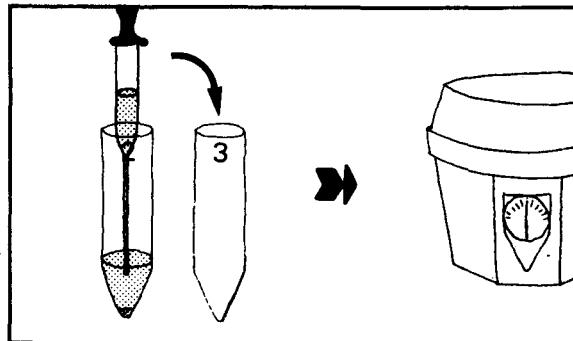
4. Prélever tout le plasma surnageant et la couche de leucocytes au-dessus des hématies.

Placer ce surnageant dans un autre tube (tube 2). Centrifuger pendant 5 minutes à vitesse moyenne.

5. Prélever tout le liquide surnageant (mais conserver le culot du tube No. 2).

Placer le liquide dans un 3ème tube (3).

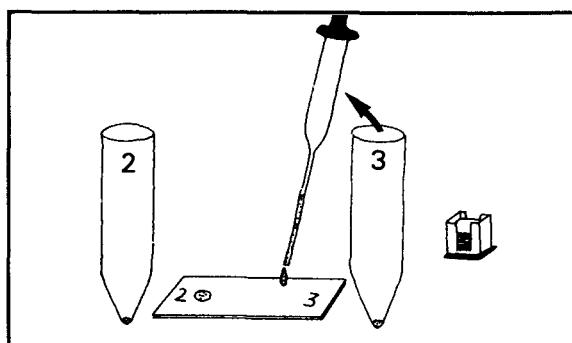
Centrifuger pendant 10 minutes à grande vitesse.



6. Examiner au microscope les culots des tubes 2 et 3, entre lame et lamelle.

Les trypanosomes apparaissent dans le culot No. 3 (et quelquefois dans le culot No. 2).

On trouvera les microfilaires dans le culot No. 2.



Méthode de centrifugation avec micro-hématocrite

Si l'on dispose d'un centrifugeur pour micro-hématocrite, on peut prélever du sang capillaire ou veineux dans un tube capillaire pour micro-hématocrite. La méthode de prélèvement et d'examen est la même que celle décrite page 208 pour les microfilaires. S'il y a des trypanosomes mobiles, ils peuvent être observés dans le plasma, juste au-dessus de la couche de leucocytes. On peut tout d'abord en déceler les mouvements en utilisant un objectif 10 x avec ouverture réduite du condenseur, et les distinguer plus nettement à l'objectif 40 x.

Autres méthodes de recherche de la trypanosomiase

Le diagnostic de la trypanosomiase africaine s'effectue également en laboratoire:

- (a) par la recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire (voir page 226)
- (b) par la recherche des IgM et des anticorps dans le sang séché sur papier-filtre (voir méthode de recherche page 287)
- (c) par inoculation immédiate à des rats ou à des souris du sang hépariné de malades (dans les laboratoires spécialisés)
- (d) par la recherche des trypanosomes dans le LCR (voir page 347).

C. TRYPANOSOMIASE AMÉRICAINE: MALADIE DE CHAGAS

La maladie de Chagas, qui sévit en Amérique centrale et en Amérique du Sud, est causée par *Trypanosoma cruzi* et transmise par des punaises. Un autre trypanosome, *T. rangeli*, infecte l'homme dans les mêmes régions à peu près. Bien que n'étant pas pathogène, il doit être identifié et différencié de *T. cruzi* pour le diagnostic de la maladie de Chagas.

Attention:

Les trypanosomes mobiles sont trouvés dans le sang au cours de la phase aiguë de l'affection et rarement après. Au stade chronique de la maladie, le diagnostic est essentiellement fondé sur des méthodes immunologiques.

Techniques de recherche

Les trypanosomes de la maladie de Chagas sont difficiles à trouver dans le sang. On utilise les mêmes techniques que pour la trypanosomiase africaine.

1. Recherche à l'état frais (résultat rarement positif au stade chronique de la maladie).
 2. Examen de gouttes épaisses répété plusieurs jours de suite.
 3. Triple centrifugation et technique de centrifugation pour micro-hématocrite, si possible.
 4. Recherche des anticorps (réaction de fixation du complément).
-

Aspect de *Trypanosoma cruzi*

Description de *T. cruzi* coloré:

<i>Forme</i>	Formes larges en "C", également formes minces, généralement en "S"
<i>Longueur</i>	environ 15 µm pour les formes larges et 20 µm pour les formes minces
<i>Cytoplasme</i>	bleu pâle
<i>Noyau</i>	large, central, rouge
<i>Kinétoplaste</i>	granulation grande et ronde, rouge foncé ou violet, près de l'extrémité postérieure
<i>Membrane ondulante</i>	étroite, rouge rosé
<i>Flagelle</i>	rose, s'étendant au-delà de la membrane ondulante.

Aspect de *Trypanosoma rangeli*

Description de *T. rangeli* coloré:

<i>Forme</i>	Formes minces uniquement, aux extrémités effilées
<i>Longueur</i>	25 à 35 µm
<i>Noyau</i>	rouge, près de la partie centrale du corps cellulaire
<i>Kinétoplaste</i>	petit, comme une tache rouge sombre, loin de l'extrémité postérieure
<i>Membrane ondulante</i>	visible, étroite
<i>Flagelle</i>	s'étendant au-delà de la membrane ondulante.

26. Trypanosomes : recherche dans la sérosité ganglionnaire

Trypanosomiase humaine africaine

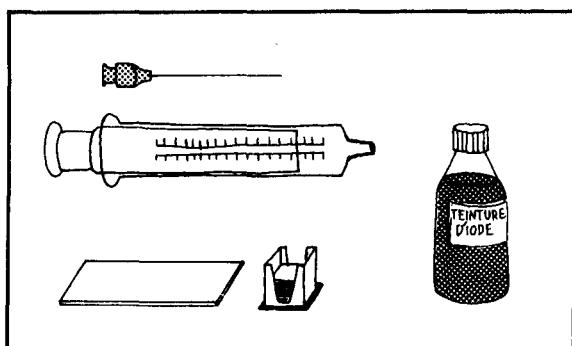
Dans la trypanosomiase humaine africaine (appelée aussi "maladie du sommeil"), on trouve les trypanosomes dans les ganglions lymphatiques (infections à *T. gambiense*) au début de la maladie, par exemple 2 à 3 semaines après transmission du parasite par la mouche tsé-tsé (*glossine*). Ils disparaissent ensuite des ganglions en 2 à 6 mois.

Principe de la recherche

Une goutte de suc du ganglion est prélevée à l'aiguille. Elle est examinée aussitôt à l'état frais entre lame et lamelle. Les trypanosomes, qui sont des protozoaires flagellés mobiles, y sont facilement observés au microscope.

MATÉRIEL

- Aiguille (pour injection sous-cutanée) 25G (0,5 mm) x 16 mm
- Seringue de 5 ou 10 ml (seringue et aiguille doivent être parfaitement sèches)
- Lames
- Lamelles
- Teinture d'iode
- Soluté physiologique (réactif No. 47).

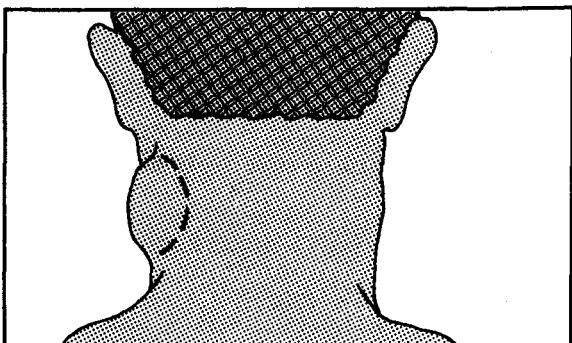


RECHERCHE D'UN GANGLION LYMPHATIQUE

Les ganglions lymphatiques se situent dans la chaîne cervicale des ganglions du cou. Palper les 2 côtés du cou, depuis la base du cou jusqu'au niveau de l'oreille.



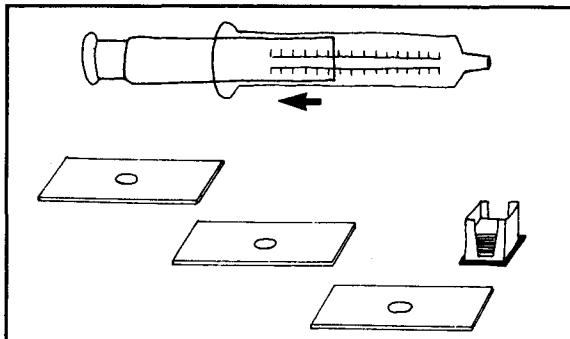
Les ganglions atteints sont gonflés et forment une petite masse ronde de 2 à 4 cm de large. Ils sont élastiques et glissent sous la peau, résistant peu à la pression. Ils ne sont pas indurés (sauf chez les malades chroniques).



PRÉLÈVEMENT

Préparatifs

Préparer la seringue et tirer le piston à fond.
Préparer 3 lames avec, sur chacune, 1 goutte de soluté physiologique.
Se laver les mains à l'eau et au savon.
Faire asseoir le malade.

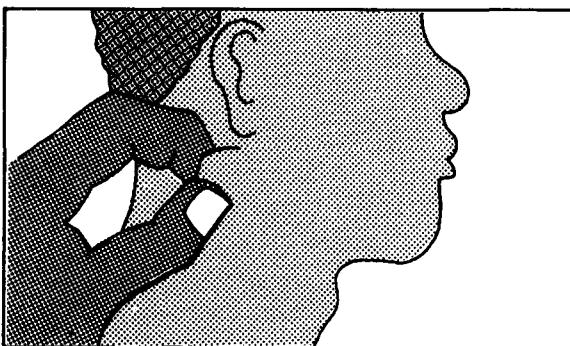


1. Désinfecter l'endroit choisi à la teinture d'iode*.

Saisir le ganglion entre le pouce et l'index de la main gauche.

Bien maintenir le ganglion fixe, tout en le faisant ressortir.

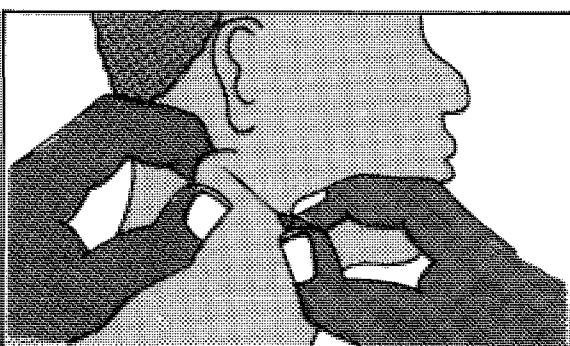
*Pour éviter tout risque de brûlure, on lavera la teinture d'iode à l'alcool. On peut utiliser un désinfectant comme le thiomersal.



2. Introduire l'aiguille perpendiculairement au centre du ganglion, en 2 temps:

- pénétrer d'abord sous la peau
- puis, pénétrer dans le ganglion.

(Veiller à ne pas atteindre les jugulaires ou les carotides).



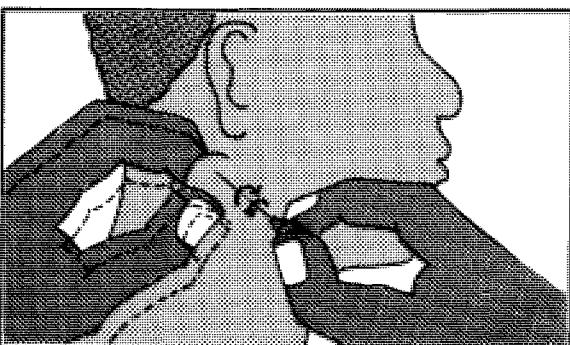
3. De la main gauche:

- malaxer doucement le ganglion.

De la main droite:

- faire pivoter l'aiguille sur elle-même.

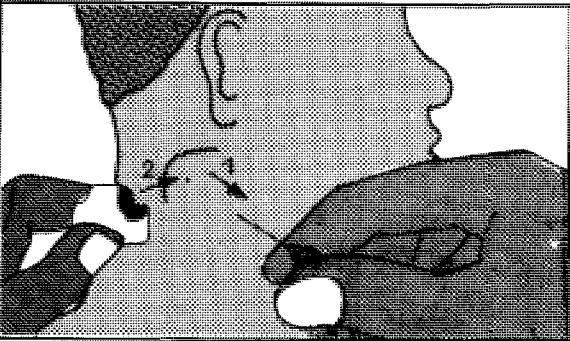
Le suc ganglionnaire monte dans l'aiguille.
L'opération doit durer environ 1 minute ½.



4. Retirer l'aiguille d'un mouvement rapide, en mettant le pouce sur la base de l'aiguille. Ensuite, poser un tampon de teinture d'iode sur le point de ponction.

(Ne jamais mettre le tampon iodé avant de retirer l'aiguille, car un peu de désinfectant pourrait mouiller la pointe de l'aiguille, pénétrer dans le suc prélevé et immobiliser les trypanosomes.)

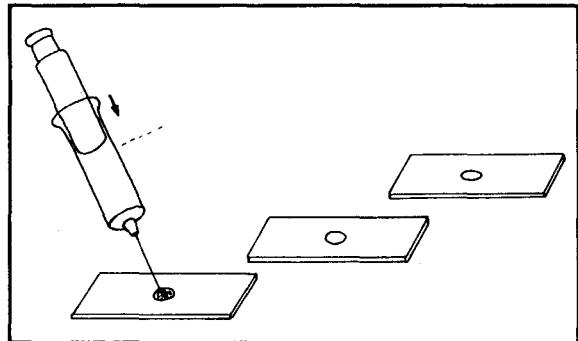
Si le ganglion est induré, aspirer directement le suc ganglionnaire dans la seringue.



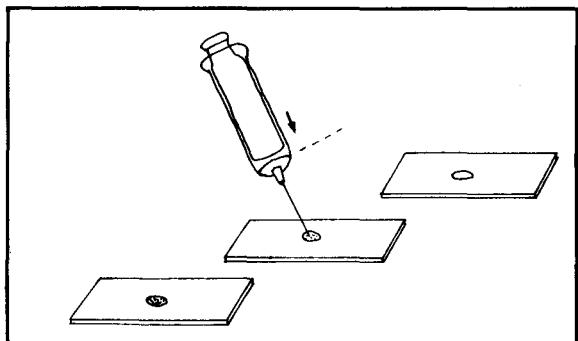
Préparation des lames

1. Fixer la seringue (piston tiré à fond) à l'aiguille.

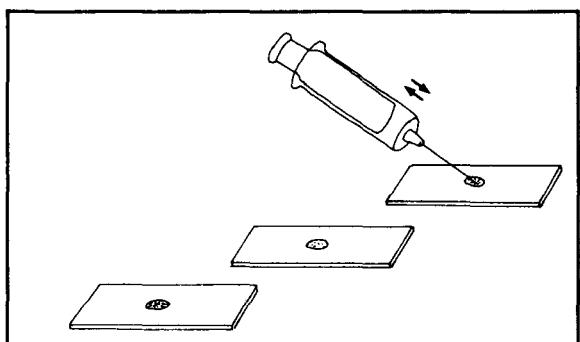
Placer la pointe de l'aiguille dans la goutte de soluté physiologique de la 1ère lame. Pousser doucement le piston à mi-course, pour déposer sur la lame le suc ganglionnaire contenu dans l'aiguille.



2. Renouveler l'opération sur la 2ème lame, en poussant à fond le piston, pour faire sortir le reste de suc.



3. Pour la 3ème lame, aspirer la goutte de soluté physiologique dans l'aiguille. Refouler et aspirer plusieurs fois pour rincer l'aiguille à fond et récupérer les dernières traces de suc ganglionnaire.

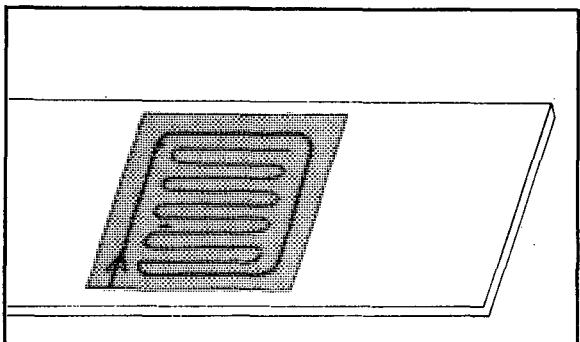


Couvrir d'une lamelle chacune des 3 préparations. Les examiner aussitôt au microscope (objectif 40 x).

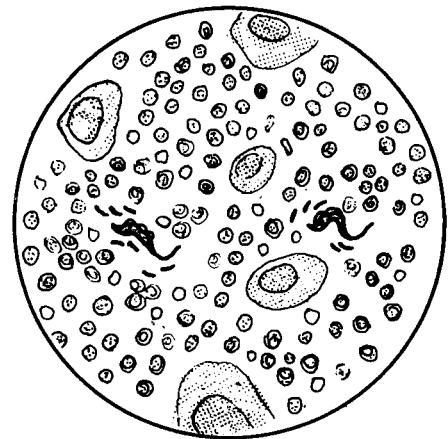
Attendre que les courants de liquide cessent dans la préparation.

Commencer par examiner *les pourtours*, près des bords de la lamelle, vers lesquels les trypanosomes ont tendance à se diriger.

Puis examiner le reste de la préparation; procéder de même pour chacune des 2 autres lames.



La préparation contient des hématies, des leucocytes et des lymphocytes. Dès qu'on repère un mouvement entre ces éléments, examiner très attentivement pour déterminer s'il s'agit bien d'un trypanosome. Ce dernier mesure environ $20 \mu\text{m}$ de long et est souvent caché par les globules, entre lesquels il se déplace en les secouant de son flagelle.

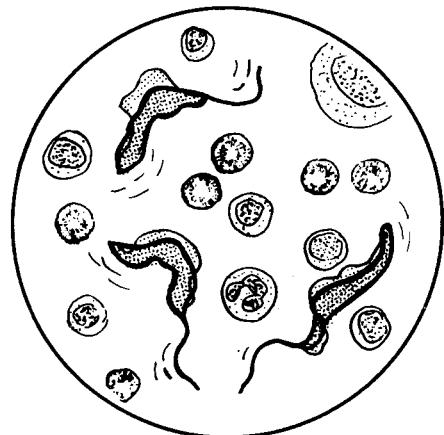


Le trypanosome

Taille 15 à $25 \mu\text{m}$ (long comme 2 à 3 hématies)
Forme celle d'un poisson allongé et ondulant
Aspect (à frais) clair, très réfringent.

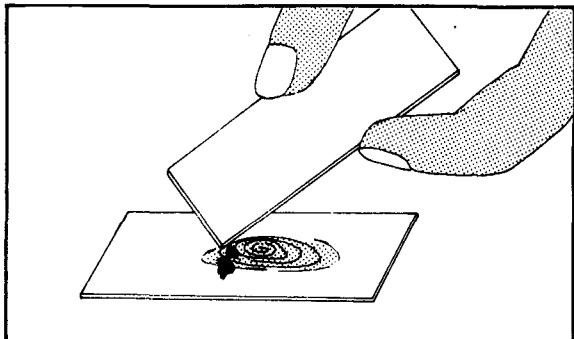
Flagelle et membrane ondulante

A l'état frais, on distingue surtout les mouvements du flagelle situé à l'avant du trypanosome. Celui-ci serpente en zigzaguant entre les globules.

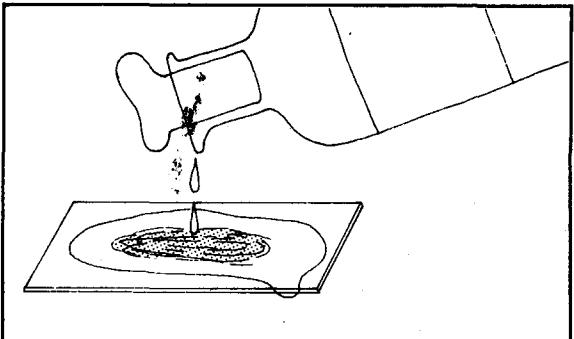


ETALEMENTS COLORÉS DE SUC GANGLIONNAIRE

Si on ne dispose pas de microscope sur place (prélèvement sur le terrain), faire un étalement large et mince à l'aide du coin d'une lame.

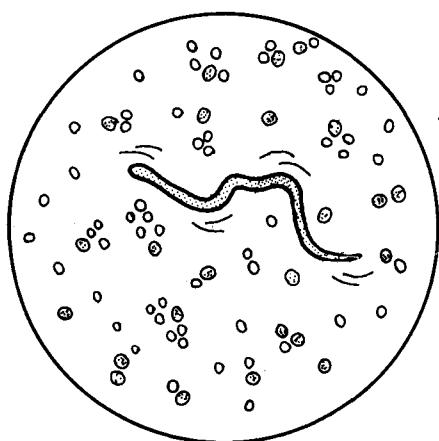


Laisser sécher. Fixer au méthanol. De retour au laboratoire, on colorera au Giemsa (voir page 193). On trouvera à la page 222 une description des trypanosomes colorés.



MICROFILAIRES DANS LE SUC GANGLIONNAIRE

Elles ne peuvent pas être confondues avec les trypanosomes, car elles sont beaucoup plus grandes (100 à 300 µm). Il peut s'agir de microfilaires sanguines (voir page 204) ou cutanées (voir page 215) prélevées au passage par l'aiguille.



B. BACTÉRIOLOGIE

Introduction

L'examen direct des étalements bactériens n'est généralement pas suffisant pour identifier l'espèce recherchée; seule la culture peut garantir une identification précise, d'où l'importance qu'il y a à recueillir des prélèvements et à les transmettre aux laboratoires de référence. Cela dit, l'examen microscopique direct des étalements colorés est un moyen efficace d'étudier la présence de bactéries dans des liquides organiques qui sont normalement stériles, tels que le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le liquide pleural, ainsi que dans des prélèvements d'autres sources. Cet examen peut apporter une information très précieuse pour le diagnostic et le traitement immédiat de la maladie, ainsi que pour la lutte générale contre l'affection. Ainsi:

- dans des prélèvements opérés sur des hommes atteints d'urétrite à un stade précoce, les infections gonococciques peuvent être diagnostiquées avec une certitude relative (chez les femmes, c'est beaucoup plus difficile)
- l'examen microscopique direct est considéré comme la méthode la plus pratique et la plus efficace pour déceler les cas infectieux de tuberculose et présente donc une grande importance épidémiologique
- l'examen microscopique d'étalements colorés et du liquide céphalo-rachidien, ainsi que l'étude morphologique de toute bactérie qu'ils peuvent contenir peut contribuer à l'identification de la méningite (mенингококковая, pneumococcique ou tuberculeuse).

Le diagnostic de certaines maladies est également possible par la sérologie, comme le prouve l'exemple de la syphilis. Les techniques sérologiques jouent elles aussi un rôle important pour la surveillance séroépidémiologique.

27. Préparation et fixation des étalements

Principe

L'échantillon à examiner (pus, crachat, culot de centrifugation d'urine, LCR, etc.) est traité de la manière suivante:

- il est étalé en couche mince sur une lame
- il est complètement séché
- il est fixé sur la lame par la chaleur, avant d'être coloré.

MATÉRIEL

*Anse ou fil de platine**: c'est un fil de métal (généralement fait d'un alliage de nickel et de chrome) fixé à un porte-fil et prenant la forme d'une boucle ronde.

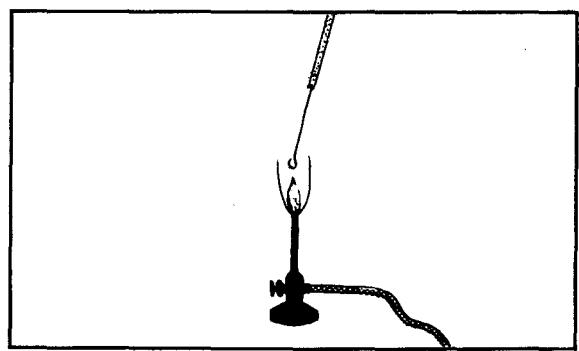
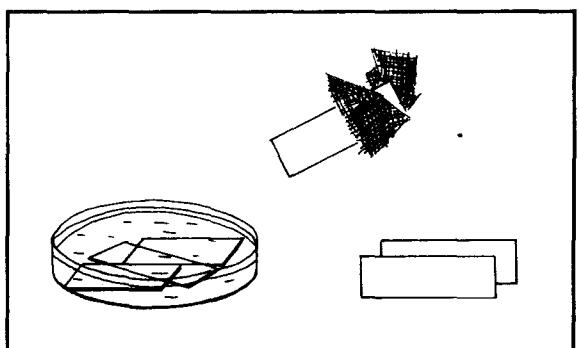
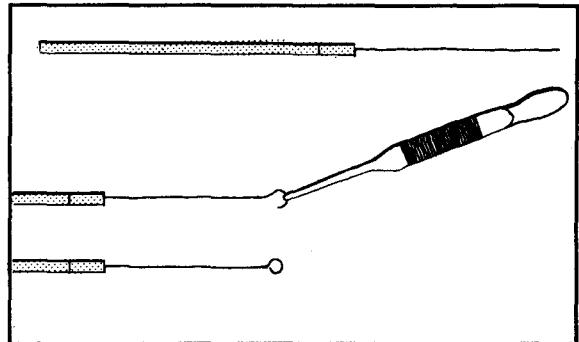
Faire la boucle à l'aide de pinces, en prenant soin de bien la centrer.

La boucle devrait avoir cette taille:  2mm

*On utilise rarement le platine qui a donné son nom à cet accessoire.

Lames de verre: les nettoyer au mélange alcool-éther et les essuyer à l'aide d'une compresse de gaze.

Bec Bunsen.

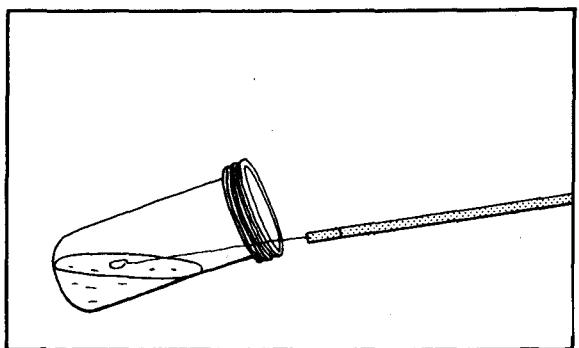


PRÉPARATION DE L'ÉTALEMENT

1. Porter l'anse au rouge:

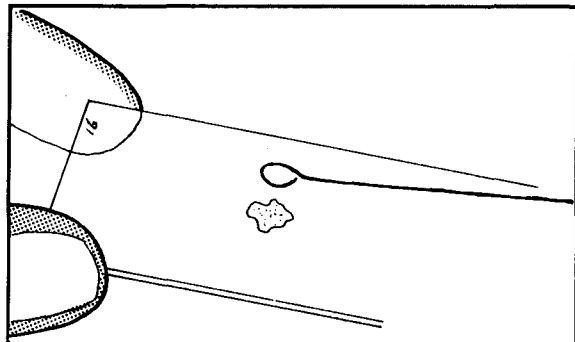
- tenir la boucle juste au-dessus de la partie bleue de la flamme
- le fil doit être aussi vertical que possible.

Laisser refroidir (compter jusqu'à 20).



2. Prélever une partie de l'échantillon à examiner en posant l'anse à plat sur la surface du liquide.

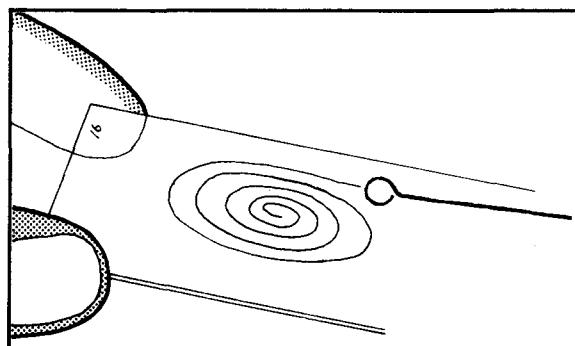
3. Déposer l'anse sur la lame et presser légèrement à plat et au centre de la lame (celle-ci doit être numérotée).



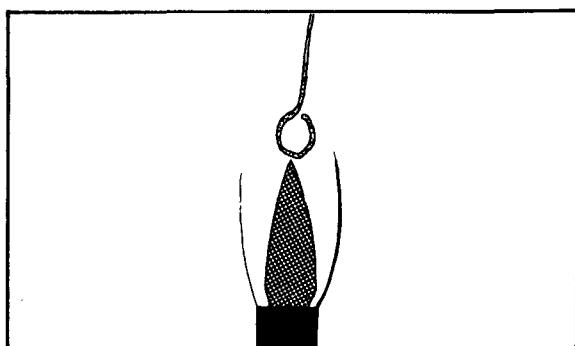
4. Tourner l'anse, toujours à plat, en stries ovales de plus en plus grandes.

Laisser un espace libre sur les 4 côtés de la lame.

Laisser sécher complètement à l'air.



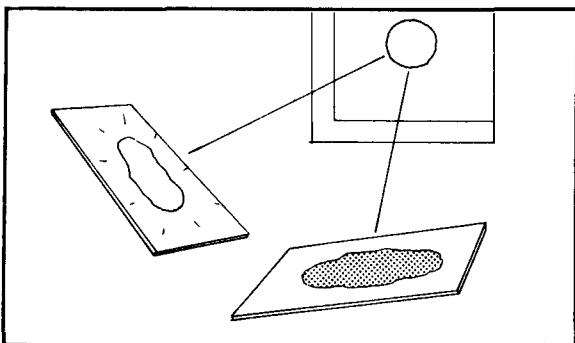
5. Porter de nouveau l'anse au rouge pour y détruire toutes les bactéries.



Le laboratoire reçoit parfois de l'extérieur des lames non marquées.

Pour reconnaître de quel côté l'étalement a été fait sur une lame non marquée:

- tourner la lame pour y voir le reflet du soleil ou d'une fenêtre
- le côté qui ne porte pas l'étalement brille
- le côté portant l'étalement ne reflète pas la lumière.

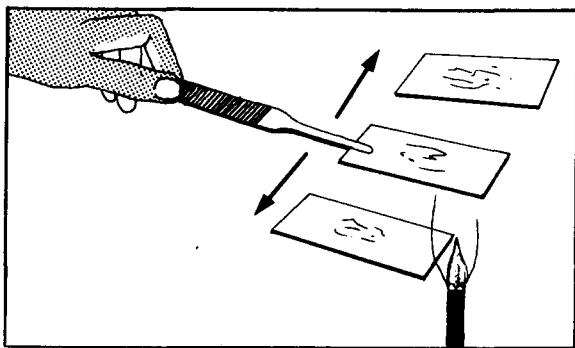


FIXATION

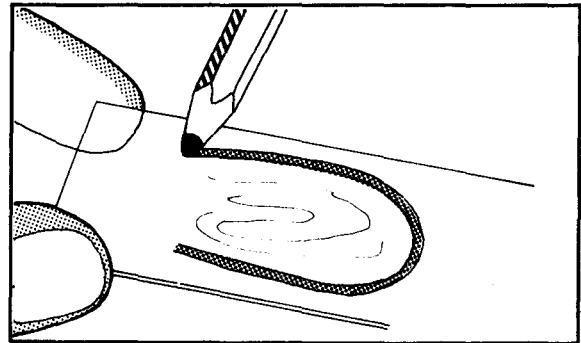
S'assurer que l'étalement est bien sec.

Passer la lame dans la flamme d'un boc Bunsen, le côté de l'étalement au-dessus. Passer 3 fois à travers la flamme.

Laisser refroidir avant de colorer.



Il est parfois utile de tracer un cercle avec un crayon gras, autour de l'étalement, pour en faciliter le repérage.



Coloration des étalements fixés

Gram, voir page 235.

Ziehl-Neelsen, voir page 249.

Lecture des étalements directs colorés, voir page 238.

28. Coloration de Gram

Intérêt

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en 2 groupes:

- les *Gram positives* colorées en violet-noir
- les *Gram négatives* colorées en rose.

Elle facilite donc leur identification.

RÉACTIFS

Violet de gentiane, adaptation de Hucker (réactif No. 56)

Solution iodée de Gram (réactif No. 34)

Alcool à 95°

Solution de safranine (réactif No. 46)

Eau du robinet.

TECHNIQUE

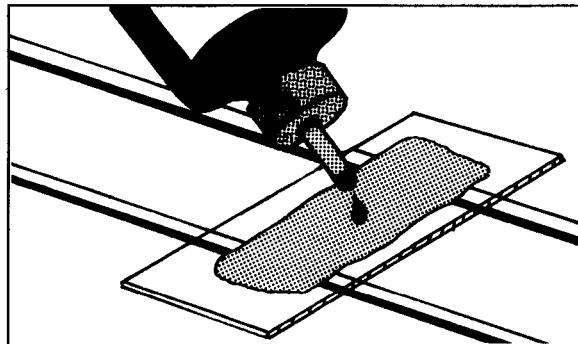
Fixer l'étalement et le laisser refroidir.

1. *Violet de gentiane – 1 minute*

Verser le violet sur la lame et l'en recouvrir entièrement.

Laisser agir 1 minute.

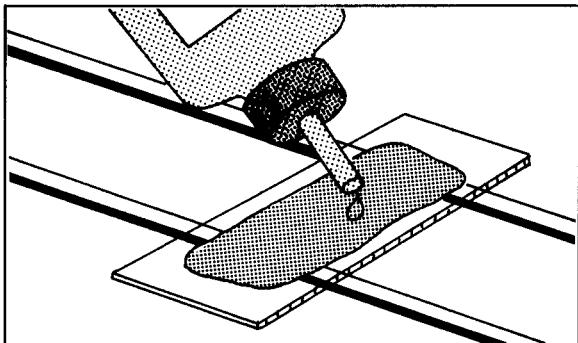
Rincer à l'eau du robinet et égoutter.



2. *Solution iodée de Gram – 1 minute*

Arroser la lame de solution iodée de Gram et laisser agir 1 minute.

Egoutter la solution et rincer à l'eau du robinet.



3. *Alcool à 95° – 1 minute*

Recouvrir entièrement la lame.

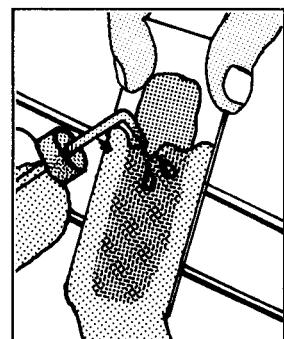
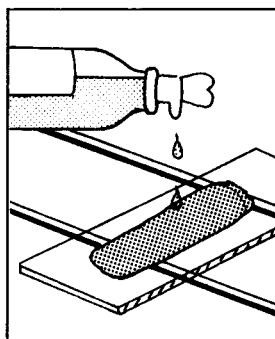
Laisser agir 1 minute.

Laver à l'eau et égoutter.

Observer l'étalement:

- s'il reste des taches violettes, remettre de l'alcool pendant 15 à 30 secondes.

Bien rincer à l'eau et égoutter.

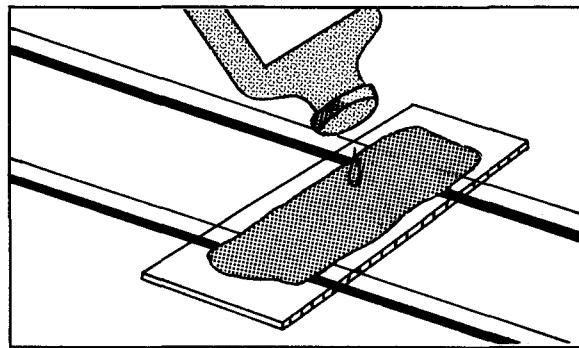


4. Solution de safranine – 10 secondes

Laisser 10 secondes sur la lame.

Laver aussitôt sommairement à l'eau du robinet.

Egoutter et laisser sécher à l'air.



QUE VOIT-ON?

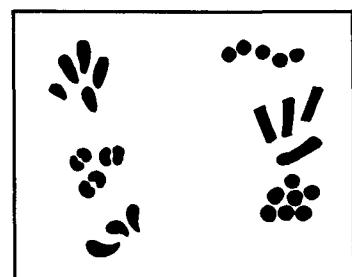
Bactéries — colorées en violet foncé: Gram positives, soit staphylocoques, streptocoques, microcoques, pneumocoques, entérocoques, bacilles diphtériques, bacilles du charbon.

Bactéries — colorées en rose: Gram négatives, soit gonocoques, méningocoques, colibacilles, shigelles, salmonelles, vibrions du choléra.

Voir à la page 238 la recherche directe de bactéries.

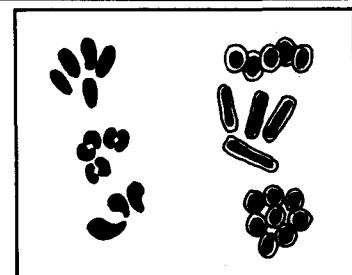
Bactéries
gram négatives

Bactéries
gram positives

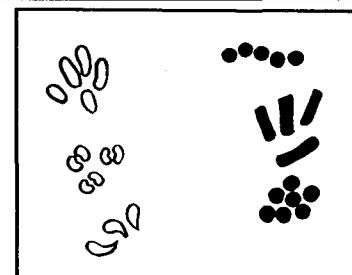


PRINCIPE DE LA COLORATION

1. Le violet colore toutes les bactéries en violet foncé.



2. La solution iodée fixe plus ou moins nettement le violet dans les bactéries.



3. L'alcool à 95°:

- Décoloré certaines bactéries où le violet n'est pas fortement fixé par la solution iodée.
- N'en décoloré pas d'autres où le violet est bien fixé par la solution iodée.



4. La solution de safranine (rose):

- Précolore (en rose) les bactéries décolorées par l'alcool.
- N'agit pas sur les autres qui restent violet foncé.

RISQUES D'ERREUR

Il peut se produire une fausse réaction Gram positive dans les cas suivants:

- étalement fixé avant d'être sec
- étalement trop épais
- dépôt de colorant dans le flacon de violet (filtrer avant l'emploi)
- solution iodée de Gram mal égouttée
- alcool laissé trop peu de temps
- solution de safranine trop forte ou laissée trop longtemps.

Il peut se produire une fausse réaction Gram négative dans les cas suivants:

- solution iodée de Gram laissée trop peu de temps
 - alcool laissé trop longtemps et insuffisamment rincé.
-

29. Germes mis en évidence par examen bactériologique direct

Les germes sont des micro-organismes très petits (0,5 à 5 µm; 10 µm tout au plus). Ceux que l'on recherche, soit au microscope, soit par culture, sont pour la plupart des bactéries, et c'est pourquoi on parle d' "examen bactériologique". La recherche des autres types de germes (rickettsies, virus, etc.) s'effectue dans les laboratoires spécialisés.

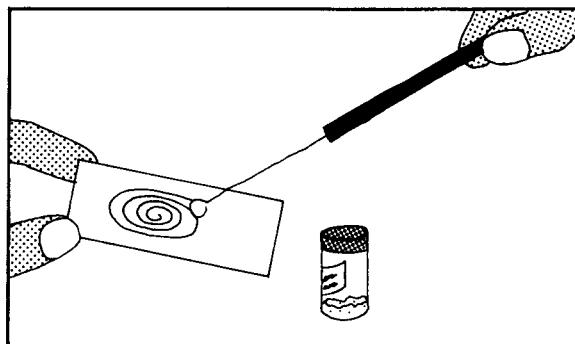
On distingue entre:

Germes pathogènes *

Ils peuvent provoquer des maladies. Les examens de laboratoire permettent de les découvrir dans des prélèvements opérés sur l'organisme infecté.

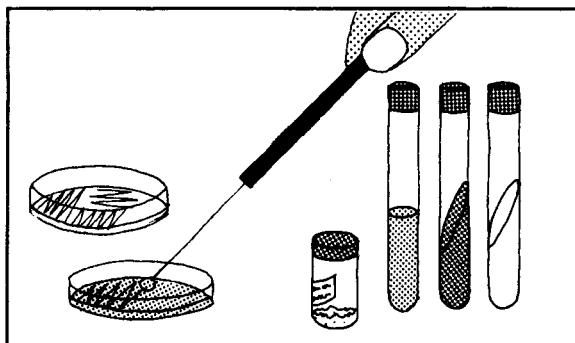
Germes non pathogènes

Sans danger, ils sont innombrables dans la nature. Certains se multiplient normalement chez l'homme sans nuire à sa santé et sont dits "saprophytes".



COMMENT ON RECHERCHE LES GERMES AU LABORATOIRE

1. Par examen microscopique direct des étalements (prélèvements de pus, d'urines, de crachats, de peau, de LCR, de nez ou de gorge), placés sur lame de verre et colorés (Gram ou Ziehl-Neelsen).



2. Par culture bactériologique:

- sur des milieux de culture solides (gélose en boîte de Pétri ou en tube)
- dans des milieux liquides (tubes de bouillon).

Les cultures sont *indispensables* pour l'identification précise des bactéries, et en particulier pour déterminer si les micro-organismes trouvés dans les prélèvements sont pathogènes ou non. On utilise pour identifier les germes cultivés des techniques biochimiques, sérologiques (agglutination) et autres.

Ne jamais manquer d'envoyer les prélèvements au laboratoire spécialisé pour culture chaque fois que c'est nécessaire (voir modalités d'envoi aux pages 268 et 273).

*Note: Germes pathogènes obligés et germes pathogènes facultatifs. Les germes pathogènes obligés causent toujours une maladie (comme le bacille tuberculeux). Les facultatifs ne sont pas pathogènes dans certaines parties du corps (par exemple le colibacille, saprophyte normal des intestins), mais peuvent le devenir s'ils envahissent d'autres régions (ainsi le colibacille peut infecter les voies urinaires).

Utilité des examens directs

Les examens directs sont des plus utiles pour donner une idée du type d'organismes en cause, ou, dans certains cas, pour poser le diagnostic de la maladie (tuberculose, lèpre, blennorragie, etc.).

Aussi est-il essentiel que le laboratoire donne une description détaillée des germes observés ainsi que de tout autre élément visible (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, etc.). (Voir page 242).

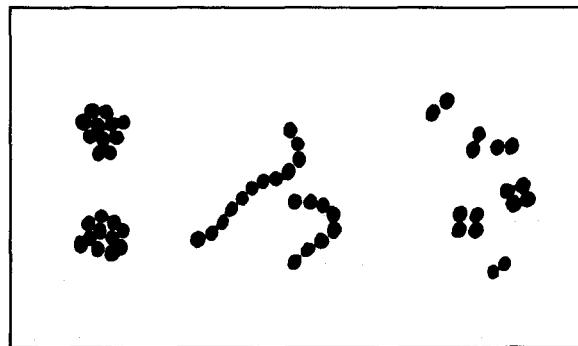
DIFFÉRENTS GROUPES DE BACTÉRIES OBSERVÉES AU MICROSCOPE (EXAMEN DIRECT – COLORATION DE GRAM)

1. Coques Gram positifs – formes rondes

Ils peuvent être disposés:

- en grappes (staphylocoques)
- en chaînettes (streptocoques)
- par 2
- par 4, etc.

Trouvés dans le pus, les urines, le sang et autres prélevements.



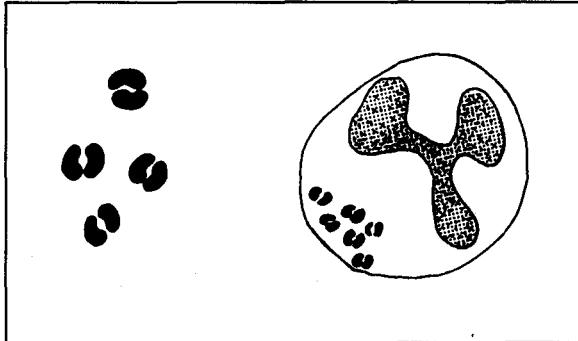
2. Diplocoques Gram négatifs – formes rondes groupées par 2

Puissent être:

- en forme de grain de café
- en amas dans le cytoplasme d'un leucocyte.

Trouvés dans le pus urétral (gonocoques) et dans le LCR (méningocoques).

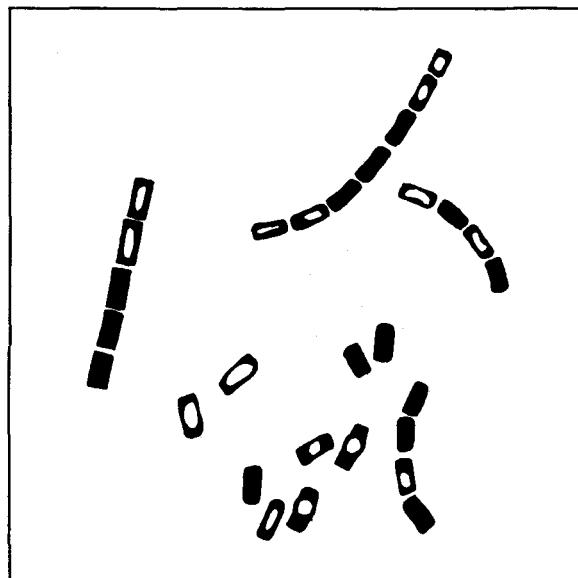
Il existe d'autres diplocoques Gram négatifs qui ne sont généralement pas pathogènes. Ils sont visibles dans les frottis de gorge ou les échantillons de crachat.



3. Bacilles Gram positifs – formes en bâtonnet

(a) Bacilles Gram positifs – avec spores

Longs et épais; extrémités carrées (anthrax) ou rondes (tétanos, saprophytes). La spore se présente comme un gros granule incolore à l'intérieur du bacille, car il n'est pas coloré par le Gram.



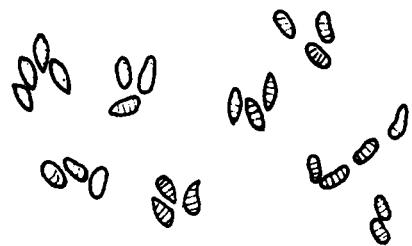
(b) *Bacilles Gram positifs – sans spores*

Généralement petits et de forme variable; leurs extrémités peuvent être gonflées; ils sont disposés en rangs ou prennent la forme de lettres. Trouvés dans les prélèvements de gorge, dans le sang, sur la peau, etc. (diphthérie, diphtéroïdes, Listeria).



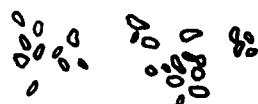
4. **Bacilles Gram négatifs**

De forme variable, bouts arrondis ou pointus. Peuvent être gros et droits (bacilles coliformes), en forme de virgule (vibrions) ou petits et gros (Proteus). Ce groupe inclut de nombreuses espèces.



5. **Coccobacilles Gram négatifs**

De forme variable, pas aussi ronds que les coques, mais pas aussi longs que les bacilles normaux (peste, Haemophilus). Se retrouvent dans toute une gamme de prélèvements.



6. **Levures et actinomycètes**

(a) *Levures*

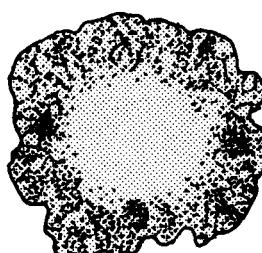
De taille variable, mais plus grosses que les bactéries. Peuvent porter des bourgeons. Généralement trouvées dans les prélèvements souillés; sont parfois pathogènes (exsudats génitaux, crachats, etc.).



(b) *Actinomycètes*

Gros grains, parfois visibles à l'œil nu (couleur blanc à jaune).

Centre Gram négatif, périphérie Gram positive. Trouvés dans le pus de la peau, les crachats, etc.



7. Spirochètes

Treponema et Borrelia

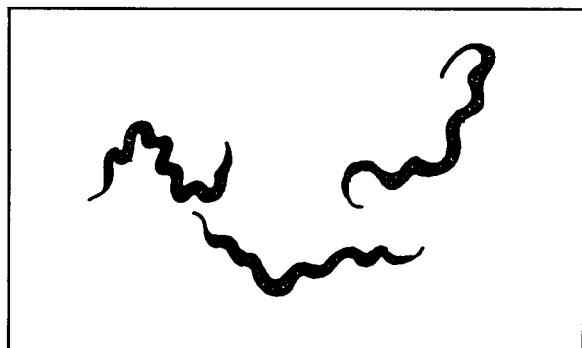
Spires irrégulières et lâches – faiblement Gram négatifs.

(a) *Treponema vincentii* (anciennement *Borrelia vincenti*)

Trouvés dans les prélèvements de gorge et de bouche (angine de Vincent), associés à des bâtonnets Gram négatifs en forme de cigare (bacilles fusiformes) (voir page 272).

(b) *Borrelia recurrentis*

Trouvé dans les étalements de sang colorés au Giemsa. Agent des fièvres récurrentes.



CAVITÉS, LIQUIDES ET TISSUS STÉRILES	CAVITÉS, LIQUIDES ET TISSUS NON STÉRILES
<p>Chez l'individu en bonne santé les éléments suivants sont stériles:</p> <ul style="list-style-type: none">– sang– liquide céphalo-rachidien– tissus sous-cutanés– organes internes (coeur, foie, reins, etc.)	<p>Chez l'individu en bonne santé, peuvent contenir de nombreux germes non pathogènes (saprophytes):</p> <ul style="list-style-type: none">– voies respiratoires (bouche, nez, gorge, crachats)– tube digestif– peau, oreille et œil– appareil génito-urinaire (vagin, urètre antérieur)
En cas d'infection, on y trouvera des germes pathogènes	

EXAMENS BACTÉRIOLOGIQUES DIRECTS: NOTATION DES RÉSULTATS

Le rapport de laboratoire doit contenir une description détaillée de tous les éléments et organismes observés dans les prélèvements, ainsi qu'une indication de quantité.

Eléments cytologiques

Type: leucocytes, hématies, cellules épithéliales.

Organismes

<i>Forme</i>	coques, bacilles, etc.
<i>Disposition</i>	par 2, en chaînettes, en grappes
<i>Coloration</i>	Gram, Ziehl-Neelsen
<i>Particularités</i>	spores, granulations, etc.
<i>Quantité</i>	rares, quelques-uns, assez nombreux, nombreux.

Exemples de rapports

1. Pus provenant d'un abcès (examen bactériologique direct) (coloration de Gram):
 - nombreux leucocytes
 - quelques hématies
 - quelques cellules épithéliales
 - assez nombreux coques Gram positifs, disposés en grappes.
 2. Urines (examen bactériologique direct) (coloration de Gram):
 - quelques leucocytes
 - rares hématies
 - quelques cellules épithéliales
 - quelques bacilles Gram négatifs.
 3. Crachats (examen bactériologique direct) (Ziehl-Neelsen):
 - 5 bacilles acido-résistants/10 champs (2+).
 4. Frottis de gorge (examen bactériologique direct) (coloration de Gram):
 - quelques leucocytes
 - quelques hématies
 - quelques cellules épithéliales
 - nombreux coques Gram positifs, disposés en chaînettes
 - quelques bâtonnets Gram positifs, sans spores (diphéroïdes)
 - quelques diplocoques Gram négatifs
 - rares bacilles Gram négatifs.
-

Attention:

Il est rare de pouvoir diagnostiquer une maladie au laboratoire en se fondant sur l'identification d'organismes décelés par examen biologique direct d'un échantillon. Le résultat de cet examen peut toutefois aider le médecin traitant à poser un diagnostic, compte tenu des symptômes constatés chez le malade.

30. Gonocoque : recherche directe dans le pus urétral. Syphilis

BLENNORAGIE

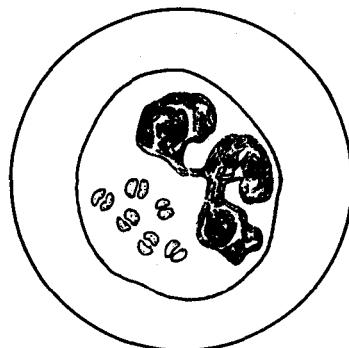
Le gonocoque *Neisseria gonorrhoea* provoque la blennoragie, maladie vénérienne très répandue, dont le temps d'incubation est de 4 à 8 jours.

Ecoulements génito-urinaires

Pus jaune, épais: gonocoque?
Exsudat blanc clair: *Trichomonas**
Exsudat blanc épais: champignons*?

Autres exsudats: urétrite non spécifique (non identifiable à l'examen direct).

**Trichomonas* et champignons, voir page 186.



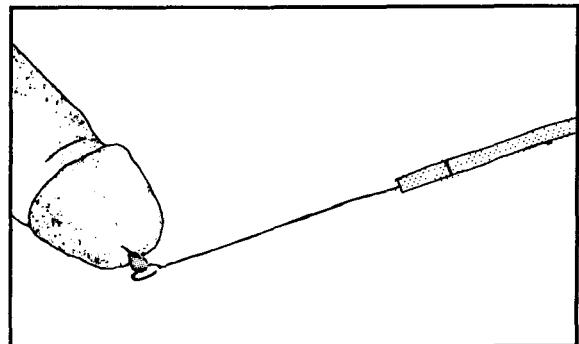
Principe

On soumet les étalements de pus uréthraux à une coloration de Gram. Les Gonocoques se reconnaissent aux 3 caractères suivants:

1. ils sont diplocoques (par paires)
2. Gram négatifs
3. intracellulaires (à l'intérieur des leucocytes).

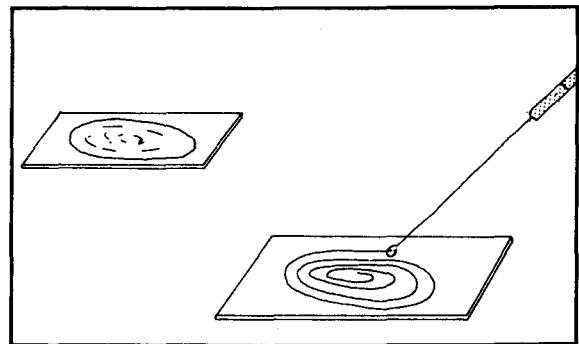
Prélèvement chez l'homme

1. Effectuer le prélèvement de préférence très tôt le matin, avant que le malade ait uriné. Si le méat est souillé, le nettoyer avec une compresse stérile imbibée de soluté physiologique.
2. Presser légèrement le pénis pour faire apparaître au méat une goutte de pus.
3. Prélever le pus avec une anse de platine stérile ou l'exprimer directement sur une lame propre.
4. Si le pus n'apparaît pas, faire pénétrer l'anse stérile sur environ 2,5 cm dans le canal urétral pour opérer le prélèvement.



5. Faire 2 étalements:

- aussi minces que possible
- couvrant une partie de la lame aussi large que possible.



Prélèvement chez la femme

Le prélèvement doit être fait au col utérin par le médecin ou par un infirmier spécialisé. En cas de blennorragie chronique, prélever juste avant ou juste après les règles.

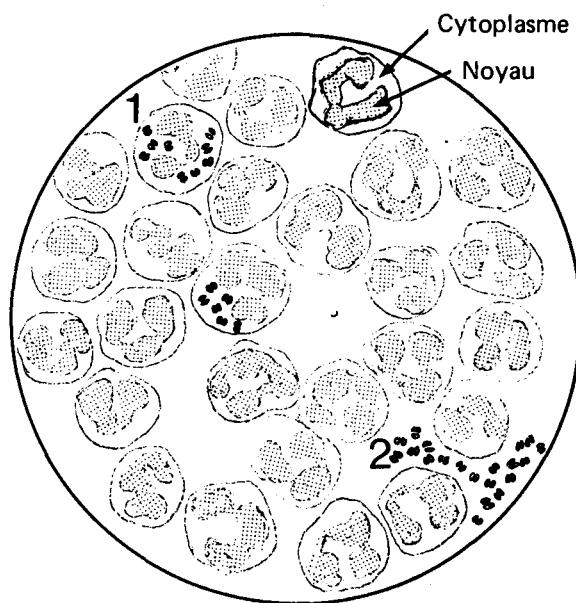
L'examen direct présente un grand intérêt pour diagnostiquer la blennorragie masculine; il a beaucoup moins de valeur dans le cas des femmes. *La culture est donc indispensable* pour isoler et identifier le gonocoque dans les prélèvements féminins.

Coloration des étalements

Effectuer une coloration de Gram (voir page 235).

Bien décolorer à l'alcool après application de la solution iodée de Gram (réactif No. 34).

Laver immédiatement à l'eau après coloration finale à la solution de safranine (réactif No. 46).



Examen des lames

Examiner surtout les bords de l'étalement, où les éléments, moins serrés, sont plus faciles à voir, le colorant y étant moins concentré.

Pus	(Voir s'il y a de nombreux amas de leucocytes altérés. Leurs noyaux sont rose vif, leur cytoplasme incolore.)
Gonocoques	ovales, en forme de grains de café, Gram négatifs (rose clair), disposés par paires
Intracellulaires	réunis en amas à l'intérieur du cytoplasme des leucocytes (1)
Extracellulaires	amas découverts entre les leucocytes, ou près d'un leucocyte éclaté (2).

Evaluation des résultats de l'examen bactériologique direct de pus urétral

Nombreux leucocytes.		Nombreux leucocytes.		Nombreux leucocytes.
Quelques hématies.		Quelques hématies.		Quelques hématies.
Quelques cellules épithéliales.	OU	Quelques cellules épithéliales.	OU	Quelques cellules épithéliales.
Assez nombreux diplocoques intracellulaires, Gram négatifs.		Pas de diplocoques intracellulaires Gram négatifs.		Pas de diplocoques intracellulaires Gram négatifs.
		Quelques diplocoques extracellulaires Gram négatifs.		Quelques diplocoques extracellulaires Gram négatifs.

CONCLUSION

Gonocoques — résultat positif

Gonocoques — suspicion

Gonocoques — résultat négatif

Autres bactéries entraînant des infections urétrales

Hommes

On peut parfois rencontrer dans les étalements de pus urétral un certain nombre d'éléments suivants:

- coques Gram positifs (staphylocoques)
- bacilles Gram positifs (diphéroïdes)
- bacilles Gram négatifs.

Voir description de ces organismes aux pages 239 et 240.

Ne jamais faire de recherche directe de gonocoques sur un étalement de culot urinaire.

Femmes

Toutes sortes de germes sont trouvés dans les étalements, notamment:

- des bacilles Gram positifs
- des coques Gram négatifs (saprophytes).

La culture est donc *indispensable*.

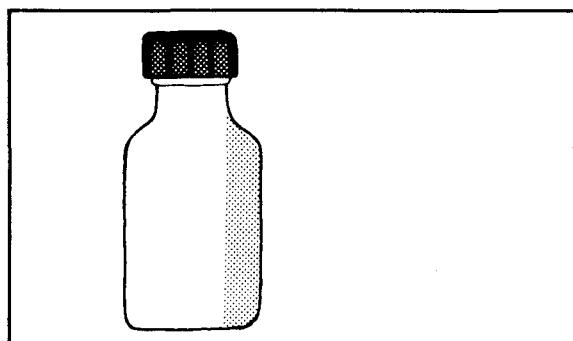
Expédition de prélèvements pour culture

A. Avec le milieu "Transgrow" de Martin et Lester*

C'est le meilleur procédé si on peut se procurer ce milieu auprès d'un laboratoire spécialisé.

Des flacons de 30 ml, contenant 8 ml de milieu solide, garnissant un côté du flacon sont remplis d'un mélange d'air (90%) et de gaz carbonique (10%). Reboucher le flacon le plus vite possible pour éviter toute perte de gaz.

Note: Pour des raisons pratiques, ce milieu est généralement conditionné en flacons plats, mais on peut également utiliser des flacons ronds, comme sur le schéma ci-contre.



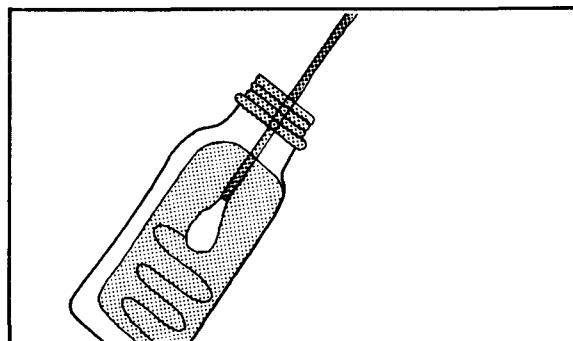
1. Placer le flacon en position verticale.

Faire le prélèvement de pus sur un écouvillon.

Dévisser le bouchon.



2. En tenant le flacon aussi droit que possible (pour éviter des pertes de gaz), frotter l'écouvillon de pus sur toute la surface du milieu solide, d'un bord à l'autre du flacon, en partant du fond.

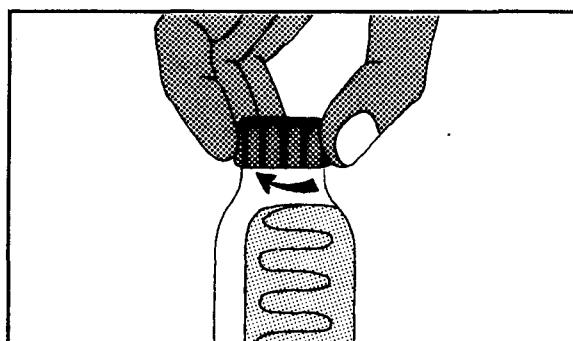


3. Revisser aussitôt le bouchon.

Expédier à température normale.

Conservation: jusqu'à 3 jours, mais plus le délai d'expédition est court, mieux cela vaut.

Ce milieu de transport est aussi utilisé pour les méningocoques.

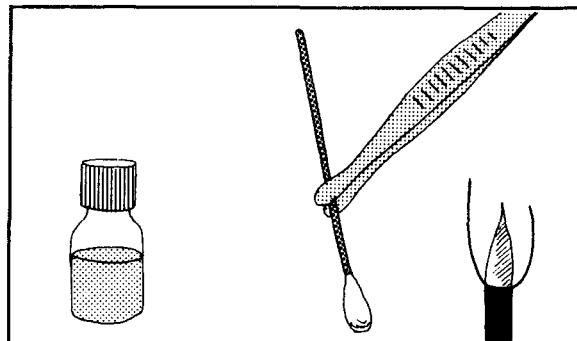


*US Department of Health, HHS/PHS Health Reports, 1971,
Vol. 86 No. 1, page 30.

B. *Avec un milieu de transport semi-solide pour gonocoque*

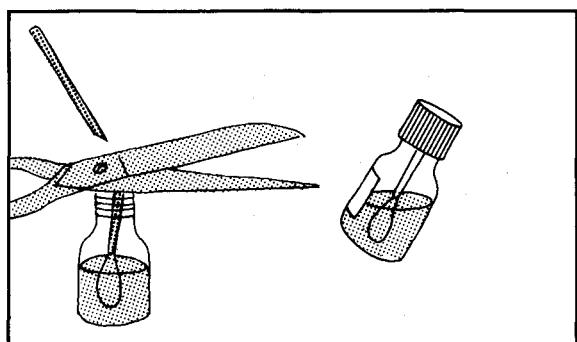
On peut utiliser le milieu de Stuart (réactif No. 50), réparti dans des petits flacons bouchés de 5 ml.

1. Prélever du pus avec un écouvillon stérile tenu à la pince flambée.



2. Enfoncer l'écouvillon dans le milieu de transport du flacon.
3. Couper la tige de bois au ras du goulot avec des ciseaux flambés.
4. Reboucher aussitôt le flacon.

Conservation: 6 heures seulement à température normale.

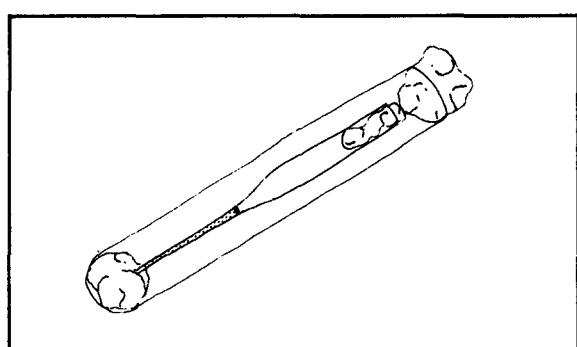


C. *Avec une pipette Pasteur*

1. Prélever le pus avec une pipette Pasteur stérile et bouchée au coton.
2. Placer la pipette telle quelle dans un tube stérile cotonné comme l'indique le schéma ci-contre.

Conservation: 6 heures seulement à température normale.

Il existe d'autres milieux; pour chacun, se conformer aux directives du laboratoire spécialisé.

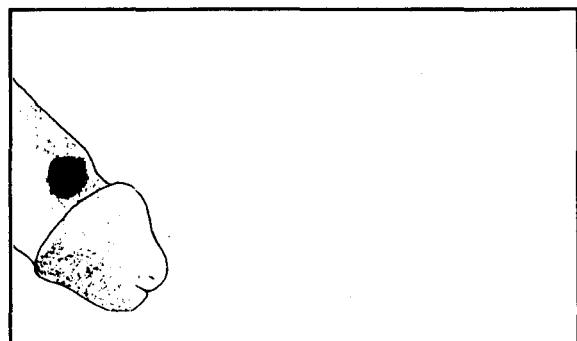


SYPHILIS

La syphilis est une autre maladie vénérienne causée par un spirochète: le tréponème pâle (*Treponema pallidum*).

Le temps d'incubation est d'environ un mois.

Le premier signe de la maladie apparaît alors, habituellement sur les organes génitaux, sous la forme d'un chancre, rond ou ovale, de 1 à 2 cm de diamètre, rouge, aux bords durs.



Syphilis non vénérienne (endémique)

Elle est trouvée dans les pays à climat semi-désertique: région sahélienne au sud du Sahara et Méditerranée orientale. Elle frappe surtout les enfants.

Pian

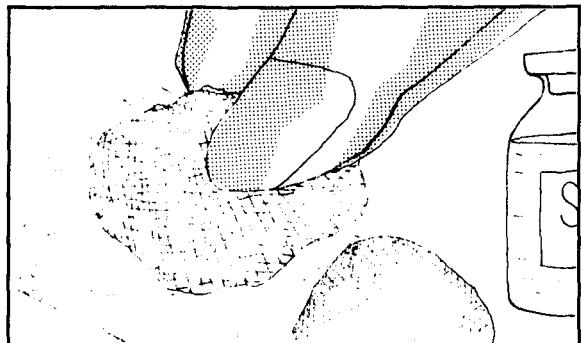
C'est une maladie non vénérienne des pays tropicaux humides. Il est causé par un autre tréponème (*pertenue*) d'aspect identique à *T. pallidum*.

Recherche directe du tréponème (à frais) dans la syphilis et le pian

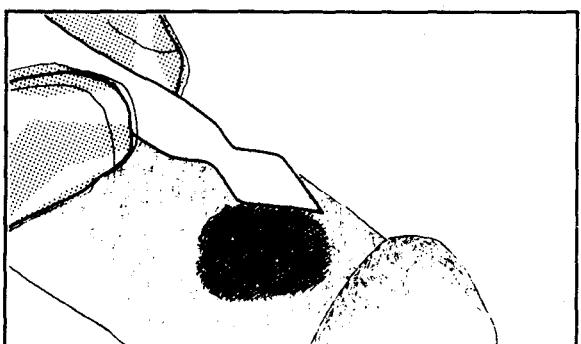
Elle ne peut être faite que par du personnel expérimenté, dans un laboratoire doté d'un microscope à condenseur à fond noir.

Si le malade a mis de la pommade sur sa lésion, la recherche est sans valeur. Dans ce cas, attendre 3 jours avant de procéder à l'examen.

-
1. Laver le chancre avec une compresse stérile de soluté physiologique. Sécher.



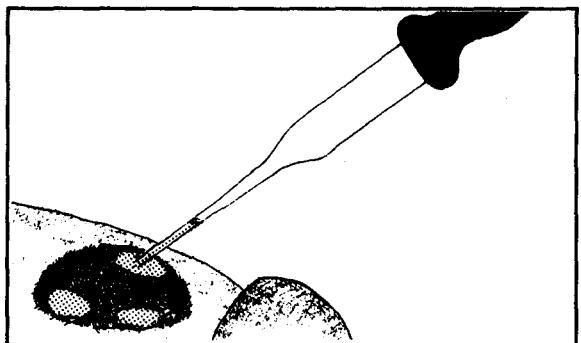
2. Gratter les bords du chancre à plusieurs reprises avec le plat d'un vaccinostyle stérile. Ne pas faire saigner.



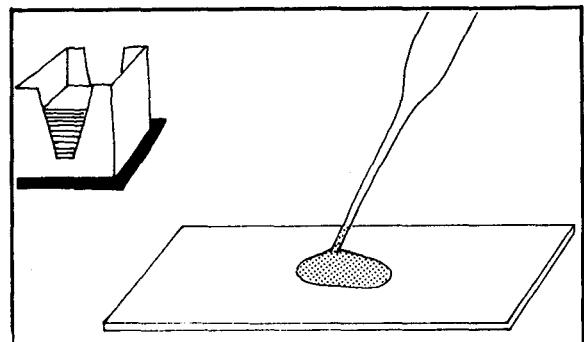
3. Presser avec 1 compresse stérile sèche.



4. Retirer la compresse et attendre quelques minutes, jusqu'à ce qu'apparaisse une sérosité rosée. L'aspirer avec une pipette Pasteur munie d'une tétine.



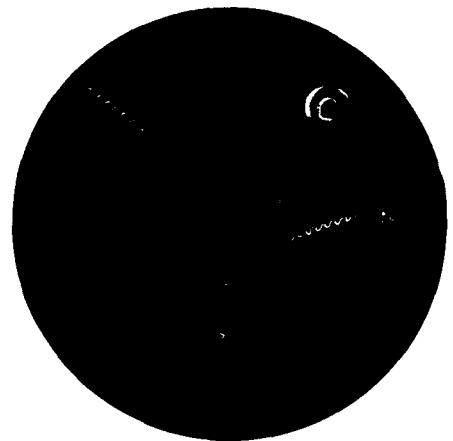
- Déposer une goutte sur une lame de verre mince (spéciale pour ultramicroscope).



- Examiner au microscope à condenseur à fond noir (ultramicroscope).

Les tréponèmes de la syphilis et du pian se reconnaissent des tréponèmes saprophytes de la peau par leurs corps très fins et leur mouvement caractéristique.

Le technicien doit avoir été spécialement entraîné à les reconnaître.



Recherche sur des étalements séchés et colorés

Elle est déconseillée, étant donné la présence de tréponèmes saprophytes sur la peau et les muqueuses.

Examen sérologique pour la syphilis et le pian, voir réaction du VDRL page 288. Cette épreuve doit être répétée après 3 à 4 semaines si la recherche des tréponèmes est négative.

31. Bacille tuberculeux. Coloration de Ziehl-Neelsen (à chaud)

Principe

Le bacille tuberculeux *Mycobacterium tuberculosis* est acido-résistant et se colore en rouge par le Ziehl-Neelsen (voir page 253), alors que presque tous les autres micro-organismes se colorent en bleu.

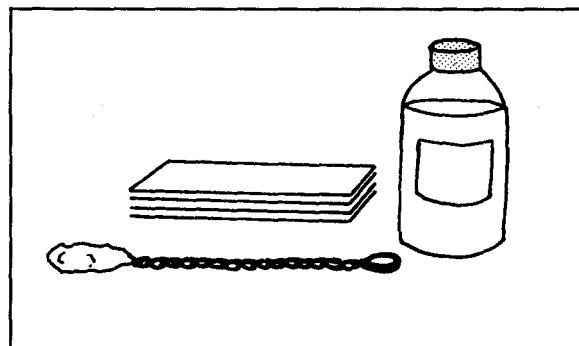
La technique décrite ci-après est fondée sur Smithwick, R.W. *Laboratory manual for acid-fast microscopy*, 2ème éd., Atlanta, US Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1976. Voir également Union internationale contre la Tuberculose, *Guide technique concernant le diagnostic de la tuberculose par microscopie directe*, Paris, UICT, 3ème éd., 1978.

Echantillon de crachat

La qualité de l'échantillon est très importante. Voir page 254 la méthode à suivre pour obtenir un échantillon destiné à l'examen direct et page 255 le mode d'expédition d'un échantillon pour culture.

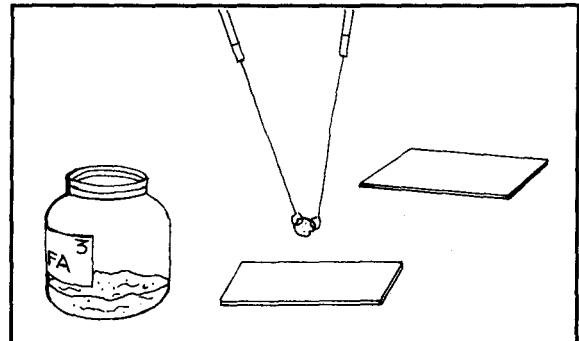
MATÉRIEL

- Lames de verre (neuves, si possible)
- Anse de platine
- Tampon de coton sur tige de métal pour flambage
- Minuterie.



RÉACTIFS

- Fuchsine phéniquée pour coloration de Ziehl-Neelsen (réactif No. 30)
- Mélange alcool-acide (réactif No. 8)
- Bleu de méthylène aqueux (réactif No. 12)
- Alcool à brûler
- Pissette d'eau distillée.



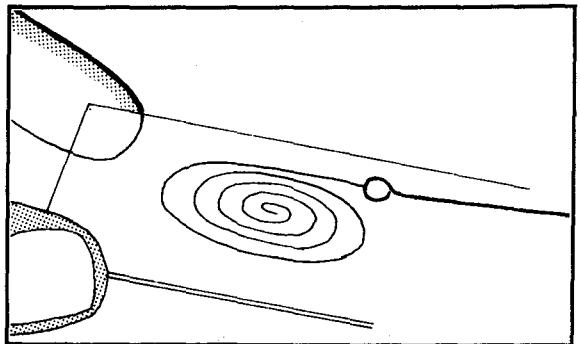
ÉTALEMENT DU CRACHAT

1. Préparer deux lames.

Prendre une parcelle purulente pour chaque lame, soit avec une anse de platine stérile, soit avec 2 anses formant pince.

2. Faire un étalement:

- aussi mince que possible
- aussi large que possible, formant des cercles concentriques bien distincts, mais sans atteindre les bords de la lame.



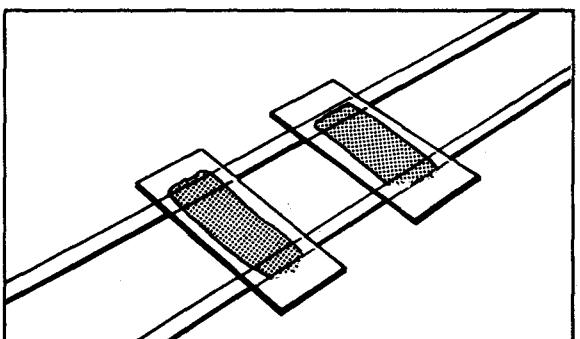
Important:

Après avoir fait les étalements, tremper l'anse dans du liquide désinfectant, pour en détacher les restes de crachat. Mettre ensuite l'anse près de la flamme, attendre qu'elle soit sèche, puis la flamber. On évite ainsi de répandre du crachat infecté, par exposition à la flamme.

3. Fixation

Laisser sécher à l'air, puis fixer l'étalement en faisant passer les lames trois fois à travers la flamme.

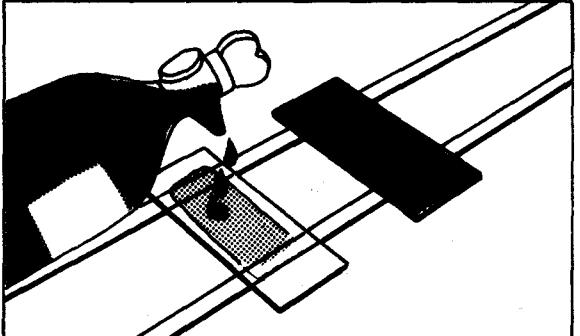
4. Placer les lames numérotées sur 2 baguettes de verre au-dessus de l'évier.



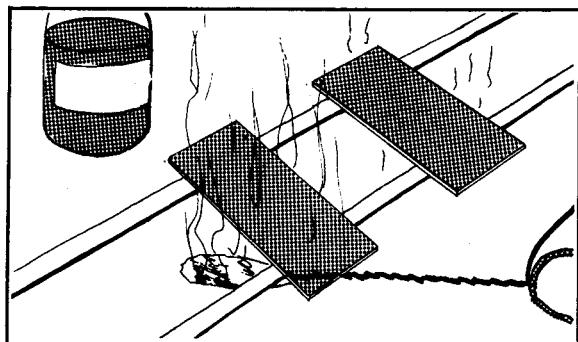
5. Coloration à la fuchsine phéniquée – 5 minutes à chaud

Recouvrir complètement les lames de fuchsine phéniquée filtrée au préalable.

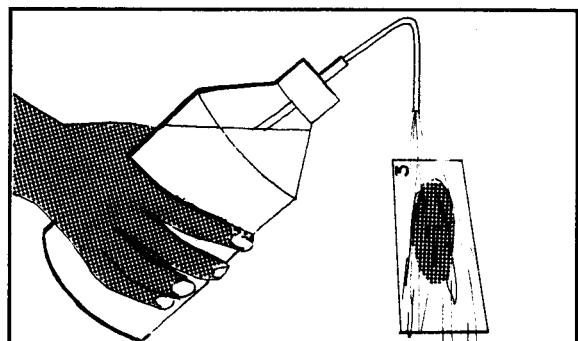
Tremper le tampon de coton dans l'alcool, l'enflammer et le passer lentement sur les lames pour les chauffer.



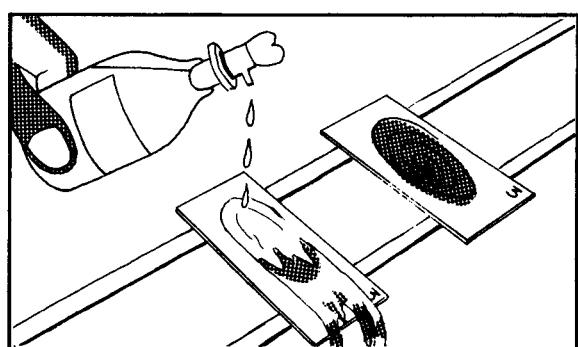
6. Dès qu'on observe les 1ères vapeurs, mettre la minuterie sur 5 minutes.
Continuer à chauffer pour maintenir l'émission de vapeur sans faire bouillir, pendant 5 minutes.
Rajouter immédiatement de la fuchsine en cours de chauffage, si le colorant commence à sécher.



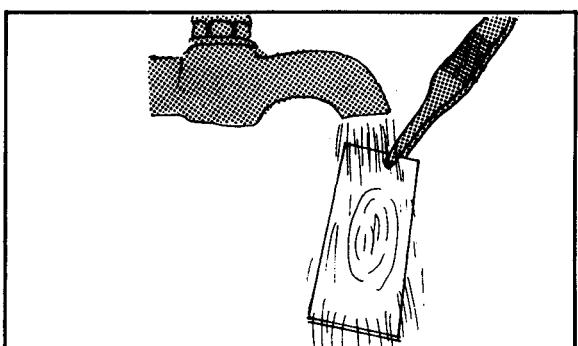
7. *Lavage à l'eau distillée*
Laisser refroidir. Laver délicatement les lames avec un jet d'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit incolore.



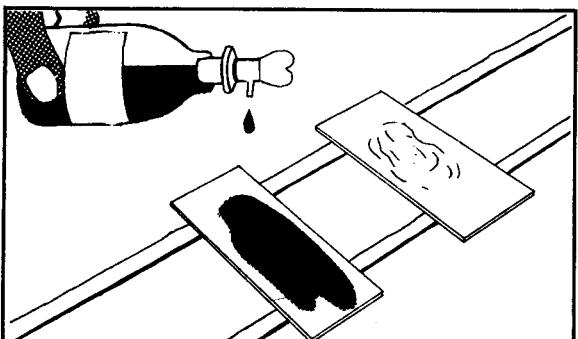
8. *Décoloration par l'alcool-acide*
Recouvrir les lames d'alcool-acide.
Attendre 3 minutes.
Laver les lames à l'eau ordinaire et les faire égoutter.
Examiner les lames: si elles sont complètement décolorées, colorer au bleu de méthylène comme indiqué ci-dessous sous 10.
S'il reste encore des taches de fuchsine (goutte épaisse) recouvrir une 2ème fois d'alcool-acide et attendre encore 1 minute.



9. *Laver à l'eau*
Vérifier que la décoloration est bien complète.



10. *Bleu de méthylène – 30 secondes*
Recouvrir les lames de colorant. Laisser agir 30 secondes.
Laver à l'eau ordinaire pendant 1 minute.
Égoutter et laisser sécher sur un ratelier à lames.



EXAMEN DES LAMES

Utiliser l'objectif à immersion.

Les bacilles tuberculeux sont:

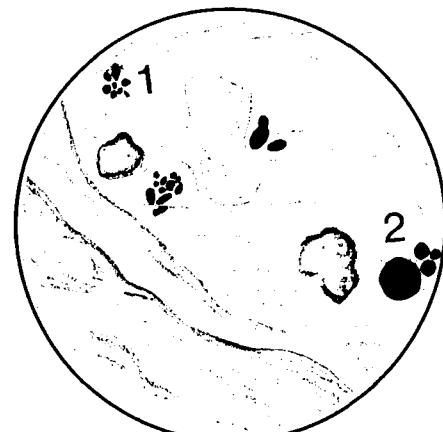
- colorés en rouge vif sur fond bleu
- droits ou légèrement incurvés
- courts (1 à 4 µm)
- souvent granuleux
- disposés par groupes de 3 à 10 bacilles serrés comme les brins d'une corde, ou en forme de lettres ou de fourches (ils sont souvent trouvés près de filaments de fibrine).



On peut, au lieu de bleu de méthylène, utiliser une solution à 0,2% de vert de malachite dans de l'eau distillée. La méthode est la même. Le vert de malachite colore le fond en vert, les bacilles se colorent en rouge.

Ne pas prendre pour des bacilles tuberculeux:

1. Des levures plus ou moins colorées en rouge. Chauffées, elles éclatent souvent en paquets de granules rouges.
2. Des taches de colorants (lame mal décolorée).

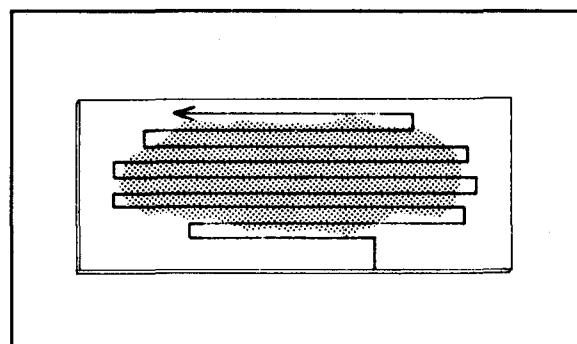


Attention:

Il existe un autre bacille pathogène acido-résistant: le bacille de la lèpre (voir page 262). On trouve dans la nature et même dans l'eau du robinet divers bacilles plus ou moins acido-résistants. Ils peuvent parfois être à l'origine d'un résultat de laboratoire erronné.

Comment examiner les lames

Examiner complètement la 1ère lame à l'objectif à immersion (éclairage maximal, pas de filtre coloré), comme indiqué sur le schéma ci-contre.



Résultat positif

Dès qu'on a observé environ 10 bacilles acido-résistants sur la 1ère lame, examiner la 2ème lame pour confirmer ce résultat positif.

Résultat négatif

Examiner toute la 1ère lame (10 minutes), puis toute la 2ème lame (encore 10 minutes).

NOTATION DES RÉSULTATS

Nombre de bacilles acido-résistants découverts*	Indiquer	ou bien
0	Rés. nég.	-
1-2/300 champs	Nombre vu	±
1-9/100 champs	Nombre/100 champs	1+
1-9/10 champs	Nombre/10 champs	2+
1-9/champ	Nombre/champ	3+
9/champ	9/champ	4+

*Méthode du Center for Disease Control et OMS in: Smithwick, R.W. *Laboratory manual for acid-fast microscopy*, 2ème éd., Atlanta, US Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1976.

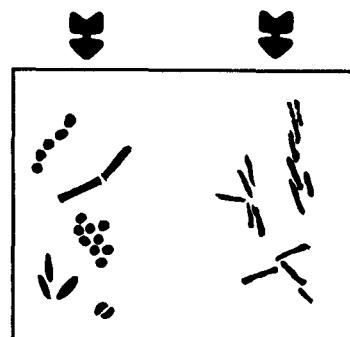
PRINCIPE DE LA COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN

Le bacille responsable de la tuberculose chez l'homme est *Mycobacterium tuberculosis*:

- type humain
- type bovis et type avium (rares).

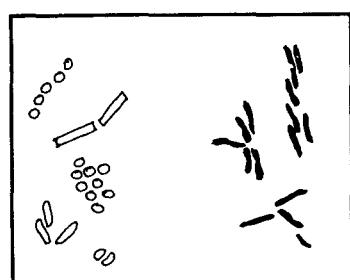
Ils sont acido-résistants, c'est-à-dire que colorés en rouge par la fuchsine, ils ne pourront plus être décolorés ni par l'acide ni par l'alcool.

Germes non
acido-résistants Bacille
tuberculeux



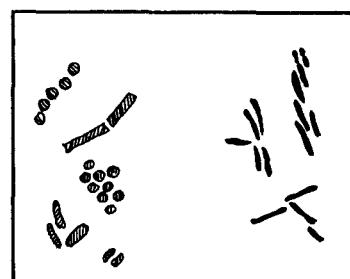
Fuchsine phéniquée:

- elle colore tous les germes du crachat en rouge.



Mélange acide-alcool:

- il décolore tous les germes et les éléments cellulaires sauf les bacilles acido-alcooloo-résistants (bacille tuberculeux).



Bleu de méthylène:

- il colore en bleu tous les germes et les éléments décolorés au 2ème temps, mais les bacilles acido-alcooloo-résistants restent rouges.

AUTRES GERMES PATHOGÈNES DÉCOUVERTS DANS LES CRACHATS

Des cultures sont toujours nécessaires pour les identifier. Mais par l'examen direct (coloration de Gram), on peut quelquefois repérer certaines espèces (voir page 239).

(a) *Pneumocoques*: diplocoques Gram positifs. Chaque paire est entourée d'une capsule qui reste incolore.

(b) *Champignons*: levures, filaments mycéliens avec ou sans spores. Il peut s'agir d'éléments pathogènes (identification indispensable par le laboratoire spécialisé) ou saprophytes, qui se sont multipliés dans le crachat après prélèvement.

(c) *Grains d'Actinomycètes*: voir page 240.

Des parasites peuvent être présents dans la préparation à l'état frais: œufs de douve du poumon et, très exceptionnellement, œufs de schistosomes et de *Syngamus*.

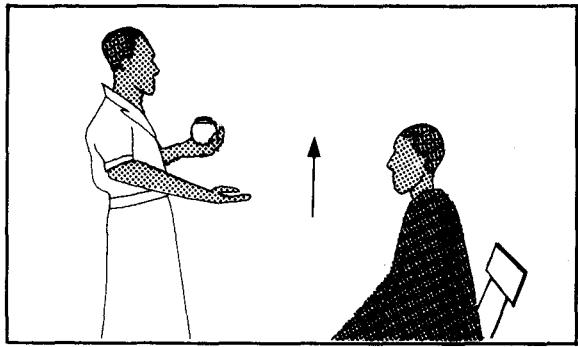


OBTENTION DE CRACHATS

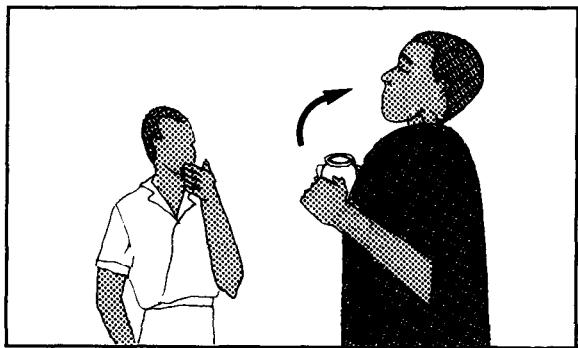
Recueillir le 1er crachat après le réveil.

L'infirmier ou le technicien de laboratoire doit être présent; on procédera de la façon suivante:

1. Le malade se tient debout, si possible.



2. Il inspire profondément, remplissant à fond ses poumons.



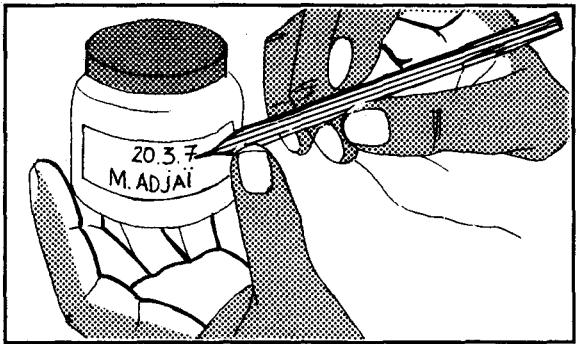
3. Il les vide d'un seul coup, en toussant très fort, du plus profond de lui-même.



4. Il crache son expectoration dans le pot prévu à cet effet.



5. Bien étiqueter le pot en indiquant le nom du malade et la date.



Pots et boîtes pour échantillons de crachats

On peut utiliser des pots réutilisables ou fabriquer au laboratoire des boîtes en carton pour recueillir l'échantillon sur place (voir page 70). Pour le nettoyage et la désinfection des récipients, voir page 40.

Après obtention de l'échantillon

Vérifier que le volume de l'échantillon est suffisant.

Les crachats de malades contiennent habituellement:

- des traînées épaisses de mucus, trouées de bulles d'air
 - de petits filaments de fibrine
 - des parcelles de pus
 - occasionnellement, des traînées brunâtres de sang.
-

Attention:

De la salive liquide et mousseuse, des sécrétions du nez et du pharynx ne constituent pas des expectorations suffisantes. Refaire cracher le malade.

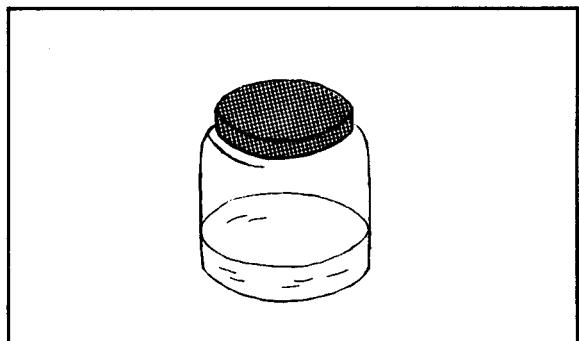
EXPÉDITION D'ÉCHANTILLONS DE CRACHATS

On les expédie pour des cultures du bacille tuberculeux (qui demandent 1 à 2 mois), pour établir des anti-biogrammes, ou pour inoculation au cobaye.

Liquide de transport

Flacon à large goulot et bouchon à visser contenant:

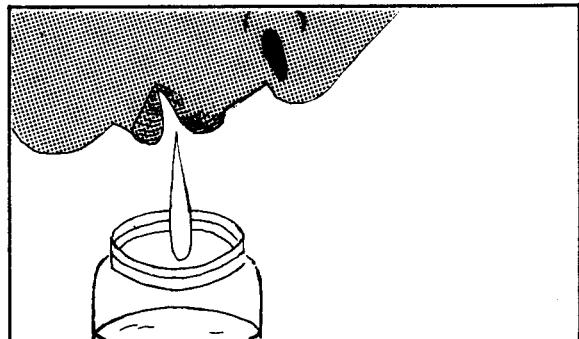
25 ml d'une solution à 0,6% de bromure de cétyl-pyridinium dans de l'eau distillée.



Prélèvement

Le malade crache directement dans le flacon sur le liquide de transport. Visser le flacon et l'expédier tel quel.

Conservation: 10 jours au moins.



Le diagnostic de la tuberculose pulmonaire peut aussi s'effectuer:

1. Par l'examen direct (et par cultures) des bacilles tuberculeux dans *le liquide de tubage gastrique* (notamment chez les enfants): centrifuger les liquides 20 minutes à grande vitesse, faire avec le culot de centrifugation un étalement qui sera coloré comme les crachats.
2. Par cultures à partir de *prélèvements laryngés*.

Pour les autres localisations de la tuberculose, on cherche le bacille dans:

1. Les urines (tuberculose rénale): voir page 305.
2. Les pus d'abcès froid fermé (tuberculose osseuse).
3. Le liquide céphalo-rachidien (méningite tuberculeuse, surtout chez l'enfant): voir page 349.
4. Les ponctions ganglionnaires.

La recherche du bacille tuberculeux dans les selles est déconseillée.

32. Bacille tuberculeux. Coloration de Kinyoun (à froid)

Principe

On utilise les mêmes réactifs que pour la coloration à chaud, mais en employant une solution de fuchsine phéniquée plus concentrée qui rend inutile le chauffage.

Les bacilles de la tuberculose (et de la lèpre) restent colorés en rouge sur fond bleu.

Intérêt

Technique plus simple et plus rapide que la coloration à chaud (voir page 249). Elle facilite les examens en série (par exemple pour les enquêtes épidémiologiques).

MATÉRIEL

- Minuterie
 - Fuchsine phéniquée de Kinyoun (réactif No. 35)
 - Acide-alcool (réactif No. 8)
 - Bleu de méthylène (réactif No. 12).
-

PRÉPARATION DES ÉTALEMENTS

Procéder comme indiqué page 249.

COLORATION

Placer les lames sur 2 baguettes de verre, au-dessus de l'évier.

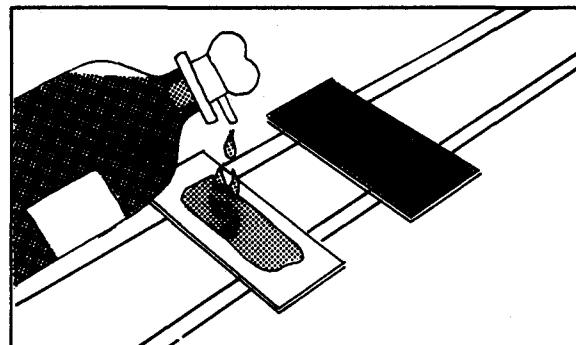
Ne pas traiter plus de 6 lames à la fois.

Bien agiter le flacon de fuchsine juste avant l'emploi.

Méthode

1. *Fuchsine phéniquée de Kinyoun – 5 minutes*
(ne pas chauffer).

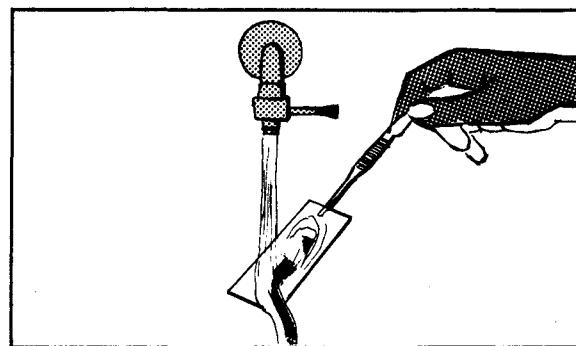
Verser la fuchsine sur les lames. Chaque lame doit être complètement recouverte.



2. Laver délicatement à l'eau ordinaire.

Rincer à fond chaque lame sous le robinet ou sous le jet d'une pissette.

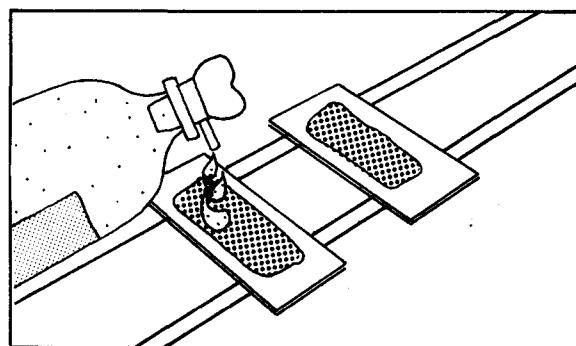
Egoutter à fond.



3. Décolorer à l'acide-alcool – 2 minutes

Recouvrir chaque lame.

Laisser agir 2 minutes (gouttes épaisses ou étalements minces), ou jusqu'à ce que l'eau de rinçage devienne incolore.



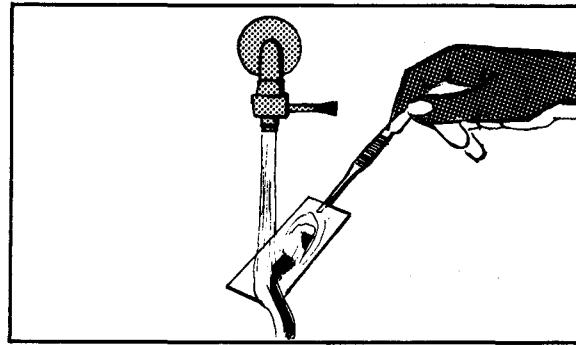
4. Laver délicatement à l'eau.

Rincer chaque lame sous le robinet.

5. Colorer au bleu de méthylène – 30 secondes

Laver délicatement à l'eau courante.

Laisser sécher à l'air.



EXAMEN DES LAMES – RÉSULTATS

Procéder comme indiqué pour la coloration à chaud (page 252).

33. Lèpre : recherche du bacille dans les nodules et les lésions cutanées

Principe

Dans la lèpre lépromateuse on trouve:

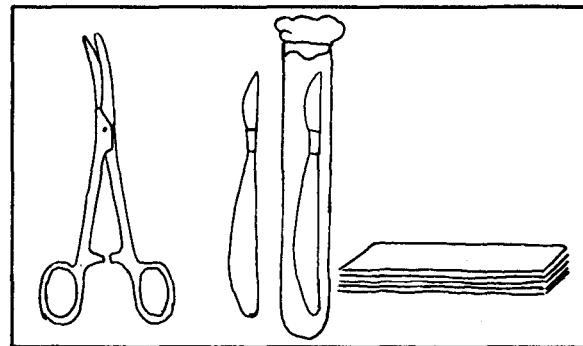
- de petits nodules sur les lobes et les bords des oreilles
- des nodules et des taches plus larges sur le visage et le corps.

Les bacilles de la lèpre sont souvent présents en grand nombre dans les lésions lépromateuses, mais ils sont généralement très rares ou pas visibles dans les lésions tuberculoïdes. Le bacille est connu sous l'appellation de *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen.

Pratiquer une incision superficielle sans faire saigner. Etaler la sérosité de l'incision sur une lame, laisser sécher à l'air, fixer pendant 3 minutes aux vapeurs de formol, et examiner au microscope après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée. *Mycobacterium leprae* est acido-résistant.

MATÉRIEL

- Scalpel
- Si possible, pinces à bouts courbés, sans griffe ou pince-clamp courbe sans griffe ou pince-clamp vasculaire
- Grande boîte de Pétri
- Lames
- Compresses
- Alcool
- Formol du commerce (37%)
- Réactifs nécessaires à la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, voir ci-dessous.



RÉACTIFS

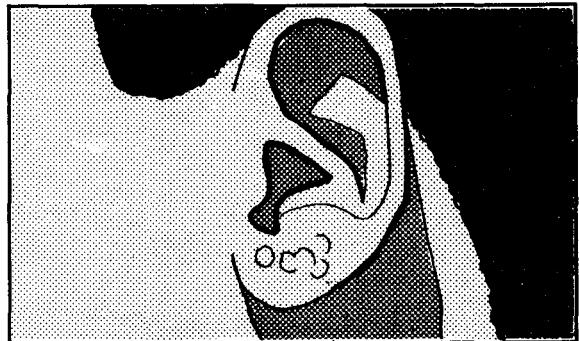
- Fuchsine phéniquée (réactif No. 30) avec solution A modifiée, contenant 10 g (au lieu de 3) de fuchsine basique
- Alcool-acide (réactif No. 8) modifié, contenant 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, 66 ml d'alcool à 95° et 70 ml d'eau distillée
- Solution de bleu de méthylène (réactif No. 12) modifiée contenant 30 ml d'alcool à 95° et 70 ml d'eau distillée.

PRÉLÈVEMENT À L'OREILLE

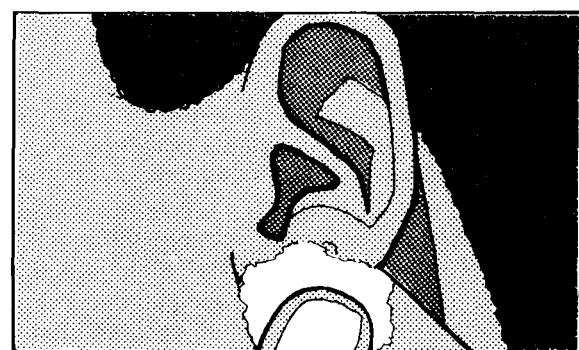
1. Examiner chaque oreille sous un bon éclairage latéral.

Rechercher les nodules: petites boursouflures (infiltrations), à surface brillante, de taille variable.

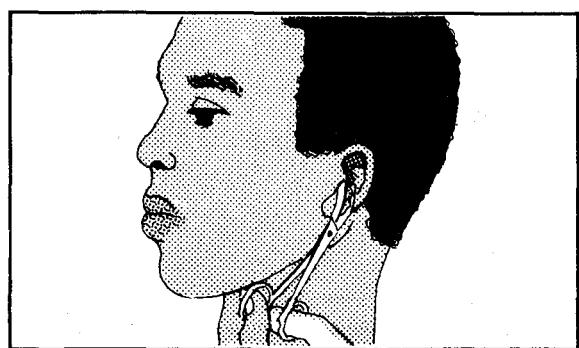
Repérer la lésion ou le nodule le plus enflammé.



2. Nettoyer le nodule à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool. Flamber pinces et scalpel. On peut aussi stériliser les scalpels à l'avance, dans de petits tubes de verre, bouchés au coton cardé. Eviter d'utiliser de l'iode.



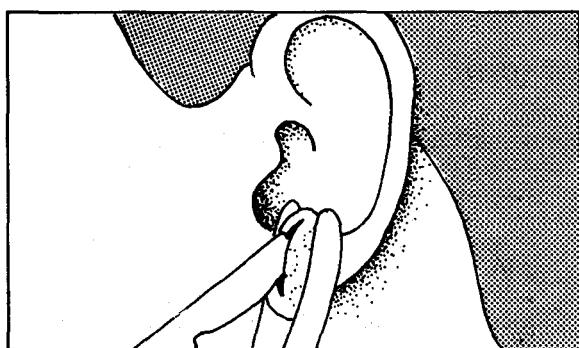
3. Comprimer énergiquement le lobe de l'oreille entre les branches de la pince *pour y arrêter la circulation sanguine*.



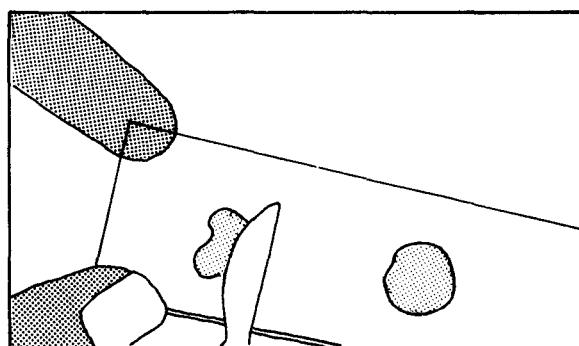
4. Les branches de la pince étant maintenues bien serrées, faire une incision dans le sens de la longueur au milieu du nodule:

- d'environ 5 mm de longueur
- et de 2 à 3 mm de profondeur.

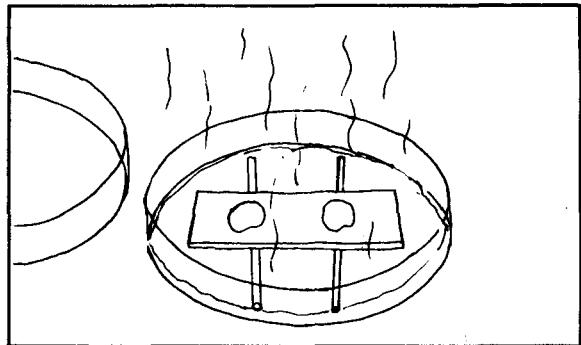
5. Tout en continuant à serrer, râcler le fond et les parois de l'incision avec la pointe et la lame du scalpel. On prélève ainsi la sérosité incolore ou rosée du nodule. Ne pas faire saigner.



6. Avec le plat du scalpel, étaler la sérosité prélevée, par un mouvement circulaire, pour former un rond de 5 à 7 mm de diamètre, sur une lame numérotée au crayon diamant. Chaque lame peut recevoir 2 à 4 prélevements provenant du même malade.



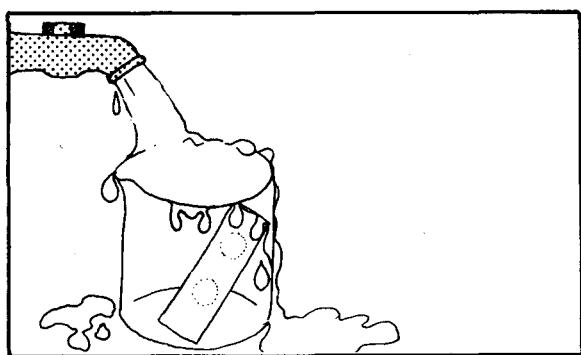
7. Laisser sécher les lames à l'abri de la poussière. Quand les étalements sont parfaitement secs, les fixer aux vapeurs de formol dans une grande boîte de Pétri contenant un support *ad hoc*. Ajouter suffisamment de formol pour couvrir le fond de la boîte. Placer les lames sur le support. Couvrir la boîte et attendre 3 minutes.



8. Coloration des lames:

- Verser sur chaque lame de la fuchsine phéniquée fraîchement filtrée et laisser tremper 20 minutes.
- Laver délicatement les lames à l'eau du robinet (dans un bêcher, le jet d'eau ne tombant pas directement sur la coloration); on peut les y laisser jusqu'à décoloration.
- Décolorer une lame à la fois en versant délicatement dessus de l'alcool-acide, jusqu'à ce qu'il coule clair et incolore.
- Laver de nouveau les lames à l'eau du robinet et les maintenir humides jusqu'à recoloration.
- Recolorer pendant 1 minute au bleu de méthylène (voir page 251).

Note: Pour une description de *Mycobacterium leprae*, voir page 262.

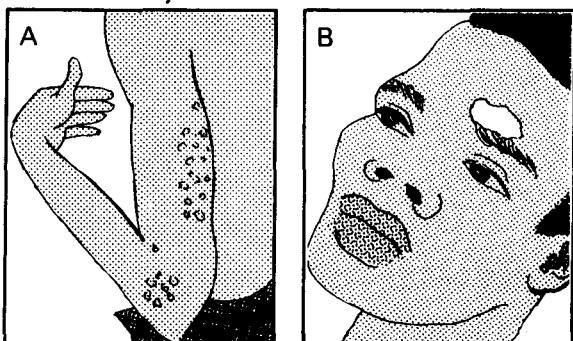


PRÉLÈVEMENT SUR LE CORPS ET LE VISAGE

Rechercher sur le corps et le visage:

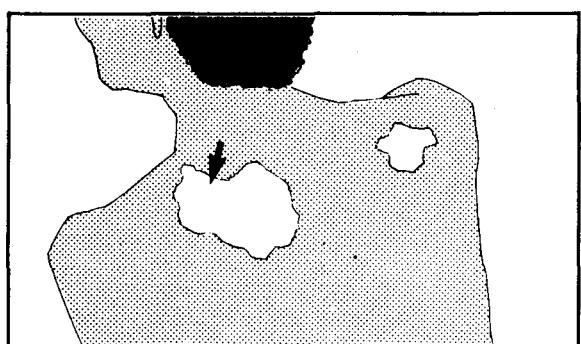
- A des lésions semblables à celles de l'oreille, mais souvent plus larges
- B des papules, des macules (taches plates) ou des plaques qui sont de couleur plus claire, ou encore des zones de peau épaisse, "peau d'orange", infiltrée.

On peut également prélever un échantillon sur une zone cutanée où l'infiltration commence juste à se manifester.

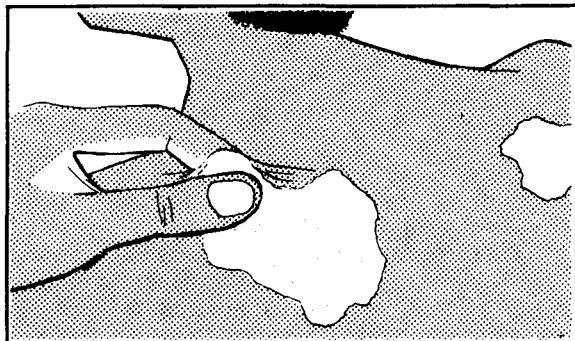


Choisir la lésion la plus infiltrée et déterminer l'emplacement du prélèvement. Il doit se trouver:

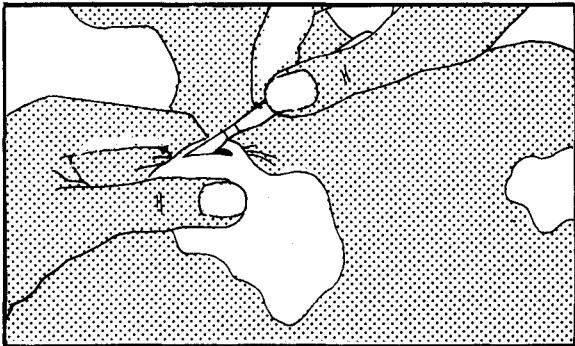
- *juste sur le bord interne de la tache*, là où la peau semble s'altérer le plus vite. (Ce choix est important pour la détection des bacilles.)



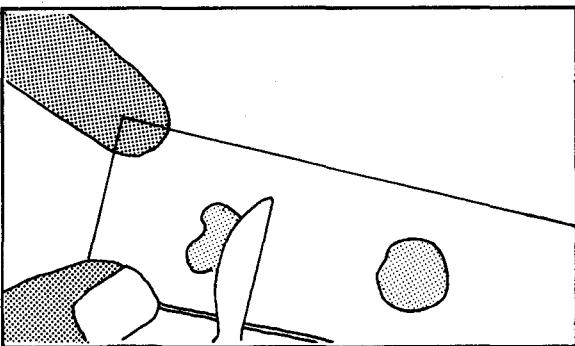
- Désinfecter avec une compresse imbibée d'alcool. Pincer fortement la région choisie avec une pince-clamp sans griffes.



- Continuer à tenir fermement. Avec la pointe du scalpel, faire une incision:
 - de 5 mm de long
 - et de 3 à 4 mm de profondeur.
- Râcler le fond et les parois de l'incision avec la pointe du scalpel. Prélever ainsi une certaine quantité de pulpe et de sérosité. (Bien pincer pour éviter de faire saigner.)



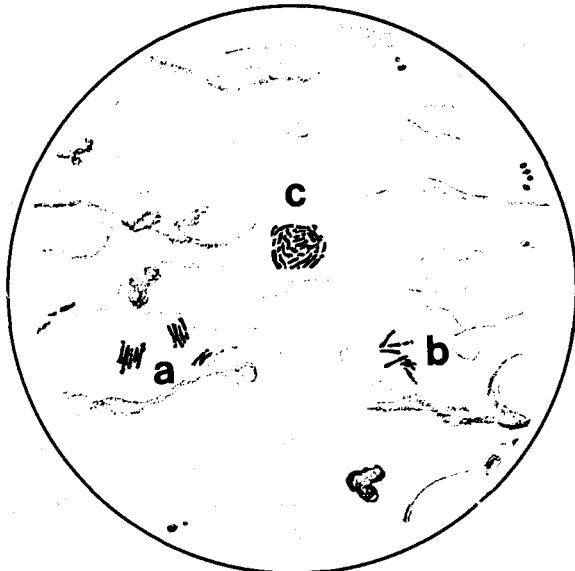
- A l'aide du scalpel, étaler le prélèvement pour former un rond de 5 à 7 mm de diamètre, sur une lame numérotée au crayon diamant. On pourra étaler 3 à 6 prélevements de taches différentes sur la même lame. Sécher et fixer comme indiqué page 261. Colorer comme indiqué page 261. Nettoyer l'incision à l'éther ou à l'alcool et appliquer un pansement si la blessure saigne.



ASPECT DES BACILLES LÉPREUX

Il est voisin de celui du bacille tuberculeux. Comme lui, il est acido-résistant et apparaît coloré *en rouge*, sur fond bleu, par la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée.

Taille	1 à 8 μm
Forme	bâtonnets \pm longs, droits ou un peu incurvés, bouts arrondis
Granulations	souvent granuleux, on voit des granulations rouge brillant séparées par des intervalles incolores
Disposition	(a) soit groupés en 2 à 5 disposés parallèlement (b) soit en groupes plus vastes ou en amas (c) soit en grand nombre, formant une masse circulaire appelée "globie".



NOTATION DES RÉSULTATS

Noter le résultat comme suit:

- prélèvement de plaques ou de nodules de l'oreille, etc.
- examen à l'objectif 100 x, avec oculaire 6 x: pas de bacilles acido-résistants observés
- ou, présence de bacilles acido-résistants (préciser en "globes", le cas échéant).

Indiquer le degré de positivité:

Pas de bacilles pour 100 champs	0
1-10 bacilles pour 100 champs	1+
1-10 bacilles pour 10 champs	2+
1-10 bacilles pour 1 champ	3+
1-100 bacilles pour 1 champ	4+
Plus de 100 bacilles par champ	5+

Importance de l'examen des plaques ou des nodules

Toujours commencer par examiner des prélèvements effectués sur des plaques ou des nodules quand il en existe.

Indices bactériologiques et morphologiques

Ces indices peuvent être calculés à la demande du médecin.

(a) *Indices bactériologiques.* Ajouter tous les résultats positifs de toutes les parties du corps sur lesquelles a été prélevé un échantillon et diviser le nombre total de cas positifs par le nombre de sièges. Par exemple:

siège 1 = oreille droite	+++
siège 2 = bras gauche	+
siège 3 = dos	++
total	6+
indice bactériologique 6/3 =	2+

(b) *Indice morphologique.* Examiner 100 bacilles sur les lames préparées. Compter le nombre de bacilles uniformément colorés en rouge dans leur longueur ("bacilles viables"). Si ce nombre est, par exemple, 8, l'indice morphologique est 8%. Cet indice est utilisé pour un premier diagnostic, ainsi que pour suivre le traitement de malades porteurs de plusieurs bacilles.

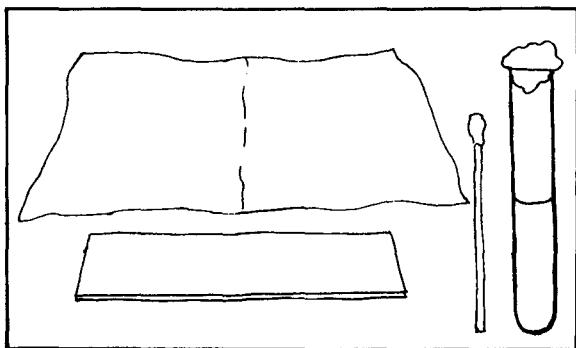
Cultures

Le bacille de *Mycobacterium leprae* n'a pas encore pu être cultivé *in vitro*, mais il peut proliférer dans les coussinets plantaires de la souris et du tatou.

34. Lèpre : recherche du bacille dans la muqueuse nasale

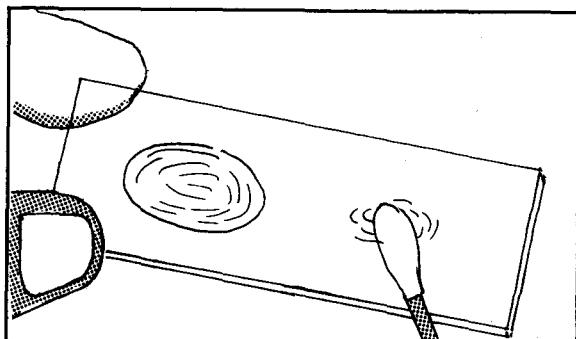
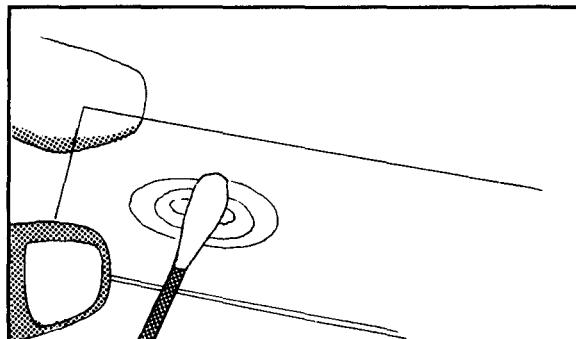
MATÉRIEL

- Mince feuille de plastique ou de cellophane
- Ecouillon de coton (le tampon de coton doit être aussi petit que possible)
- Lames numérotées au crayon-diamant
- Tube de soluté physiologique (réactif No. 47)
- Réactifs nécessaires pour une coloration de Ziehl-Neelsen modifiée: voir page 259.



Prélever l'échantillon le plus tôt possible dans la matinée. Le malade se mouche à fond dans une petite feuille propre et sèche de cellophane ou de plastique.

1. Avec un petit écouillon de coton légèrement imbibé de soluté physiologique, transférer une partie de l'échantillon de la feuille de plastique sur une lame marquée.
2. Etaler aussi uniformément que possible. On peut faire deux étalements (ou plus) d'un même prélèvement sur une seule lame.
3. Laisser sécher.
4. Une fois l'étalement sec, le fixer aux vapeurs de formol (voir page 261).
5. Colorer selon la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée (voir page 261).
6. Examiner au microscope et noter les résultats comme il est dit pour la recherche du bacille dans les nodules et les lésions cutanées (voir page 263).



INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'EXAMEN DES MUCOSITÉS NASALES

Type de lèpre	Résultat de l'examen
— lépromateuse	très souvent positif
— borderline	souvent positif
— tuberculoïde	généralement négatif
— indéterminée	souvent négatif

Attention:

La recherche du bacille de la lèpre doit surtout être pratiquée à partir de prélèvements opérés sur des lésions cutanées (oreilles, visage, corps). Cette recherche est décrite à la page 259. L'examen des mucosités nasales fait également partie des activités de routine.

Il convient cependant de noter que ces mucosités peuvent parfois contenir des bacilles acido-résistants non pathogènes qui ne sont pas des bacilles de la lèpre.

35. Peste : recherche du bacille

Principe

Pour confirmer la présence d'une infection pesteuse, il faut isoler et identifier le bacille de la peste, *Yersinia pestis*. Lors d'épidémies ou d'épizooties, il est souvent possible de poser un diagnostic présomptif, fondé sur la présence des bacilles bipolaires caractéristiques de la maladie, en ayant recours à la coloration de Wayson (réactif No. 57), sur des échantillons prélevés par aspiration sur des bubons.

1. PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

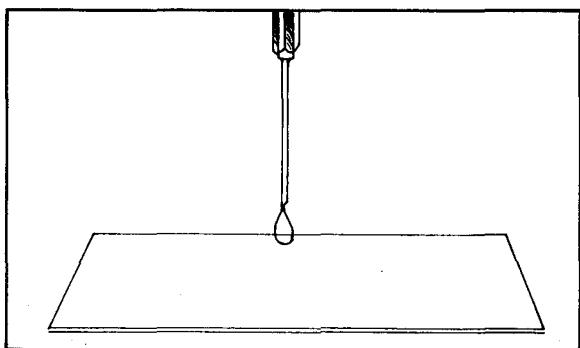
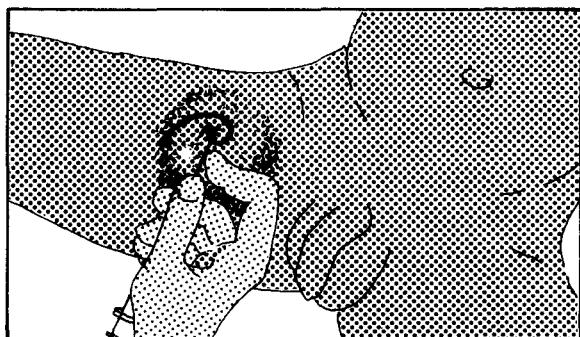
Matériel

- Seringue de 10 ou de 20 ml, à aiguille 18 G (1,2 mm) ou 19 G (1,0-1,1 mm)
- Teinture d'iode
- Alcool à 70°
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Lames

Méthode

1. Désinfecter le bubon à la teinture d'iode.
2. Aspirer quelques millilitres de soluté physiologique dans la seringue à travers l'aiguille.
3. En tenant la seringue entre le pouce et l'index de la main droite, introduire l'aiguille dans le bubon.
4. Avec la main gauche, tirer lentement le piston de la seringue. Du liquide (qui peut contenir du sang) doit pénétrer dans la seringue.
Si ce n'est pas le cas, injecter du soluté physiologique dans le bubon en appuyant délicatement sur le piston avec le pouce. Imprimer à l'aiguille, dans le bubon, un mouvement circulaire. Puis, tirer de nouveau lentement le piston jusqu'à ce que la seringue soit, si possible, à moitié pleine.
5. Retirer la seringue et tamponner le point d'injection à l'aide d'un tampon de coton imprégné d'alcool.
6. En tenant la seringue droite, laisser couler 2 à 3 gouttes de l'aiguille sur une lame et préparer un étalement comme il est dit à la page 232.
7. Si le liquide doit être envoyé pour culture à un laboratoire spécialisé, en inoculer quelques millilitres à un milieu de transport Cary-Blair (réactif No. 14) et expédier le récipient scellé, à bouchon vissé, dans un double emballage (voir page 74).
8. Immerger seringue et aiguille dans du phénol à 5%, en retirant délicatement le piston (pour la désinfection de matériel infecté voir page 39).

Attention: Lorsqu'on manie du liquide bubonique, il faut absolument éviter de produire un aérosol (projection dans l'air de gouttelettes minuscules) qui pourrait infecter accidentellement d'autres personnes et répandre la peste pneumonique.



2. RECHERCHE DU BACILLE

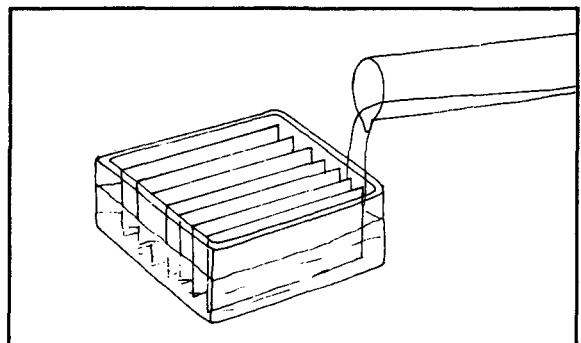
Matériel

- Alcool (chimiquement pur)
 - Lames
 - Colorant de Wayson (réactif No. 57)
 - Eau du robinet.
-

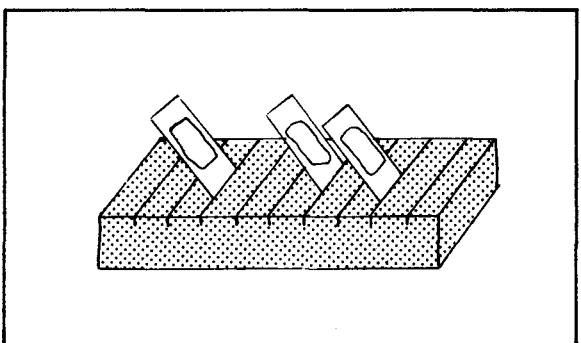
Méthode

1. Fixation

- (a) Placer les étalements séchés à l'air dans une cuve de coloration remplie d'alcool chimiquement pur pendant 5 minutes.
-

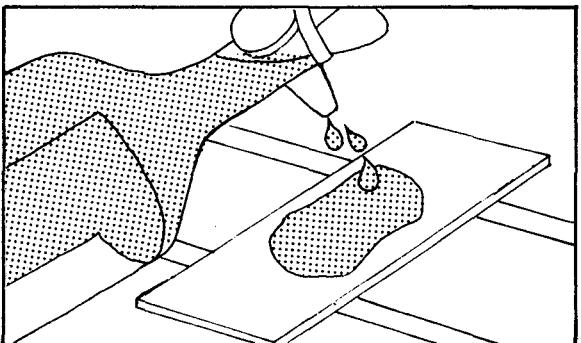


- (b) Enlever les lames et les laisser sécher à l'air, avant de les colorer.
-

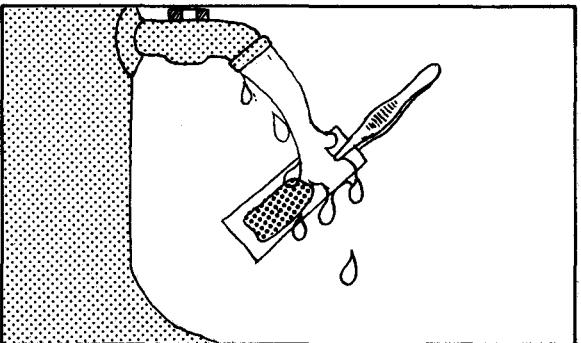


2. Coloration

- (a) Une fois les étalements fixés, les couvrir de colorant de Wayson, pendant 10 à 20 secondes.
-



- (b) Laver soigneusement les lames sous l'eau du robinet.
-



- (c) Les laisser sécher et les examiner alors à l'objectif à immersion (100 x), en cherchant dans les zones minces de l'étalement les bacilles caractéristiques de la peste.
-

Résultats

Au colorant de Wayson, les deux pôles de *Y. pestis* apparaissent en bleu, tandis que le reste de l'étalement est rougeâtre.

36. Expédition d'échantillons de selles

On est souvent appelé à expédier des échantillons de selles à des laboratoires spécialisés pour culture bactériologique:

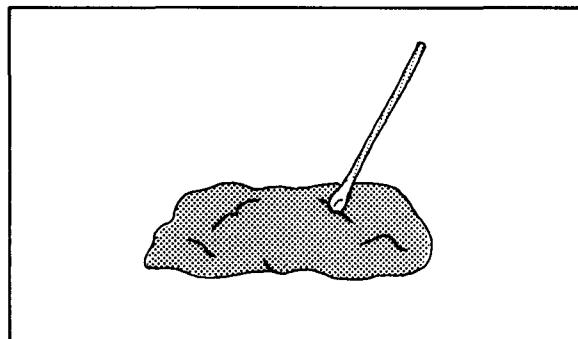
- pour la recherche des vibrios cholériques
- pour la recherche d'autres bactéries dysentériques (*Salmonella*, *Shigella*, etc.)

On peut utiliser le même mode d'expédition pour ces deux recherches si l'on a recours au milieu de transport Cary-Blair (réactif No. 14).

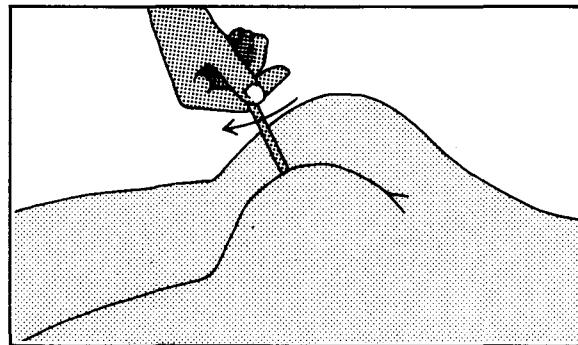
MILIEU DE TRANSPORT DE CARY-BLAIR

Le milieu de transport de Cary-Blair préserve jusqu'à 4 semaines de nombreuses sortes de bactéries entériques (vibrios cholériques, autres vibrios, salmonelles, shigelles, etc.). Avant d'être utilisé, le milieu peut être conservé pendant 8 à 12 semaines à température ambiante, dans un flacon scellé.

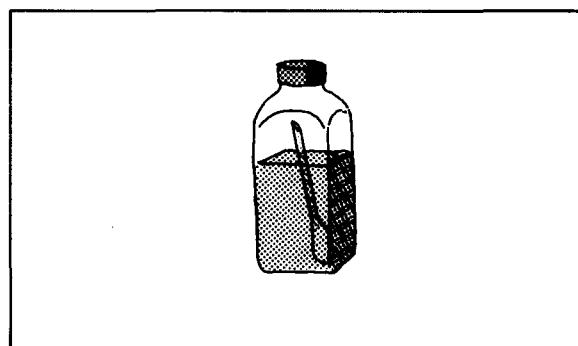
1. Tremper un écouvillon-coton stérile dans un échantillon de selles.



2. Pour les nourrissons, ou pour des malades n'ayant pas fourni d'échantillon de selles, faire un écouvillonnage rectal. Tremper l'écouvillon dans du soluté physiologique et l'introduire dans le rectum. Lui imprimer à plusieurs reprises un mouvement circulatoire.

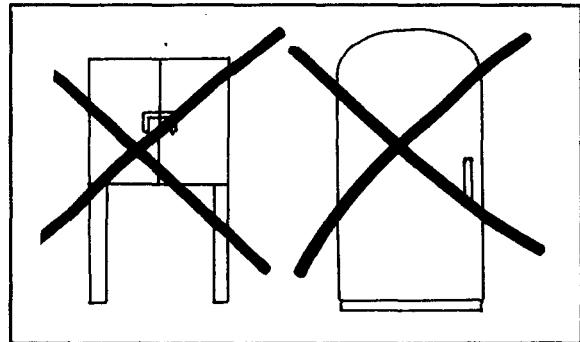


3. Placer l'écouvillon dans un flacon aux trois quarts plein de milieu de Cary-Blair. En cas de délai inévitable, conserver à température ambiante.



Attention:

1. Ne jamais conserver à l'incubateur.
2. Ne jamais conserver au réfrigérateur.



SOLUTÉ SALIN TAMPONNÉ GLYCÉRINE

Lorsqu'on doit expédier des échantillons pour culture de micro-organismes intestinaux autres que les vibrios cholériques et que l'on ne dispose pas de milieu de transport de Cary-Blair, on peut employer du soluté salin tamponné glycériné (réactif No. 33).

Note: Si le soluté conservé dans un petit flacon a viré du rose au jaune, le jeter et en préparer à nouveau.

1. Il est recommandé d'utiliser un petit flacon de 7,5 ml. Le remplir jusqu'à 2 cm du goulot.
2. Placer l'écouillon dans le milieu et l'expédier directement au laboratoire de bactériologie.

37. Examen direct de frottis de gorge. Envoi d'échantillons

Intérêt

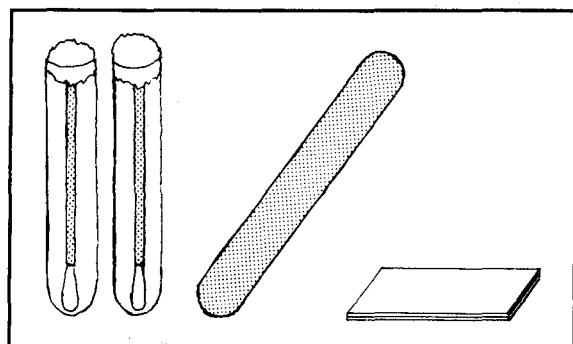
L'examen microscopique direct d'un étalement coloré préparé à partir d'un frottis de gorge peut parfois donner des indications sur le germe responsable de la maladie. Mais seule la culture bactériologique permettra d'identifier ce germe avec certitude.

Germes responsables d'affections de la gorge

- bacilles diphtériques (*Corynebacterium diphtheriae*)
- streptocoques
- association fuso-spirochétique
- *Candida* (champignon)
- diverses autres espèces moins courantes.

MATÉRIEL

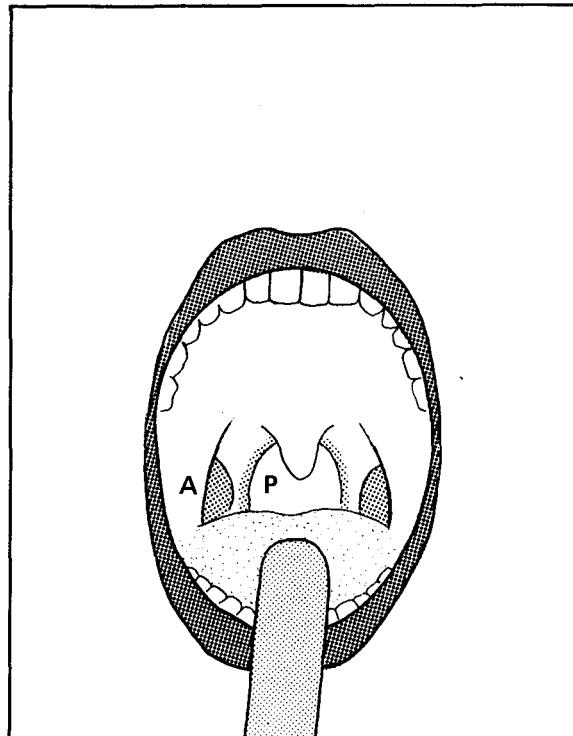
- Ecouvillon-coton stérile en tube pour prélèvements (voir leur préparation page 274)
- Abaisse-langue ou cuillère
- Réactifs pour coloration de Gram (voir page 235).



PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Il sera fait de préférence par le médecin ou l'infirmier, mais le technicien de laboratoire peut être appelé à le pratiquer.

1. Faire asseoir le malade face à la lumière (utiliser une torche électrique).
2. Demander au malade d'ouvrir la bouche sans tirer la langue et de dire "Aaaa...".
3. Pendant ce temps, d'une main, appuyer l'abaisse-langue sur les 2/3 avant de la langue. On doit voir apparaître les amygdales (A) et le fond de la gorge encadré par les piliers (P).
4. De l'autre main, introduire l'écouvillon. Ne pas toucher la langue qui est chargée en germes.
5. Repérer la partie malade (enflammée) de la gorge. Elle sera très rouge, ou blanche selon le cas. En général, l'infection sera située sur les amygdales ou les piliers.
6. Frotter l'écouvillon sur la partie enflammée, assez énergiquement, en le tournant un peu sur lui-même et râcler les membranes éventuelles.
7. Si on ne remarque rien d'anormal, écouvillonner les amygdales, les piliers et le voile du palais.

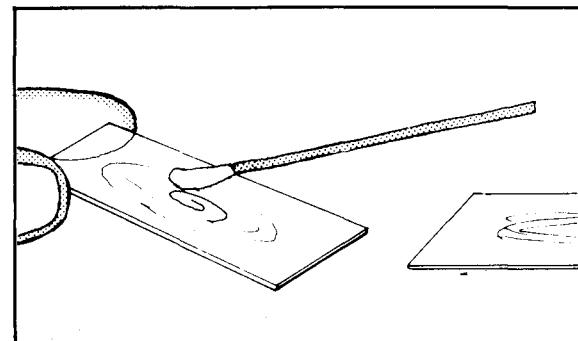


PRÉPARATION DE L'ÉTALEMENT

Frotter l'écouvillon en tournant sur 2 ou 3 lames pour faire un étalement large et suffisamment épais.

Si on doit ensemencer ou expédier dans un milieu faire 2 écouvillonnages:

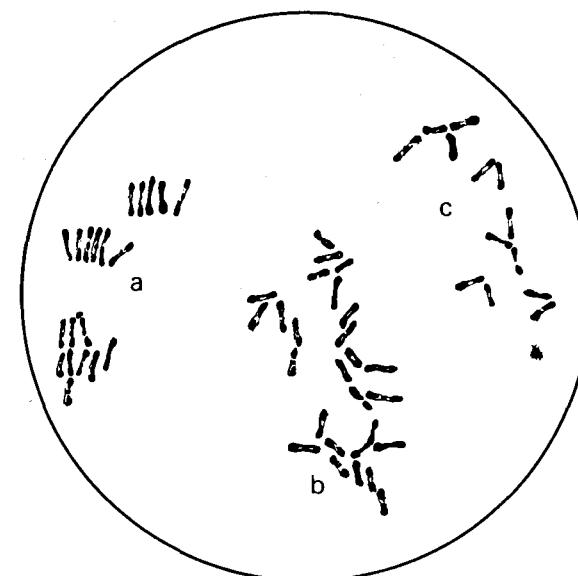
- le 1er pour le milieu
- le 2ème pour les lames d'examen direct.



EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE – RECHERCHE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE

Dans tous les cas, faire une coloration de Gram (voir page 235). Si l'on redoute une diphtérie, placer un écouvillon dans un milieu de Loeffler* et l'adresser au laboratoire spécialisé.

*Disponible auprès du laboratoire de référence.



Aspect des bacilles diphtériques

Bâtonnets Gram positifs, fins, droits ou légèrement incurvés, souvent renflés à une extrémité ou aux deux. Ils peuvent être:

- disposés en rangées (a)
- ou dispersés (b)
- ou en forme de V (c).

Notation du résultat

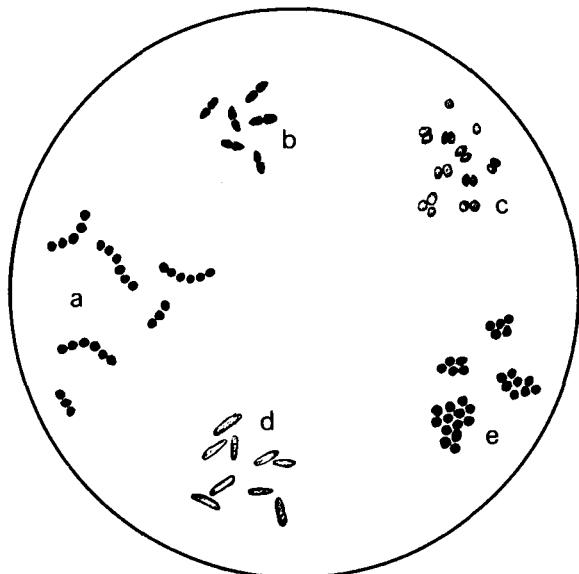
Indiquer la présence de bactéries Gram positifs, ressemblant à *Corynebacterium diphtheriae*. En effet, le bacille diphtérique ne peut être identifié en toute certitude que par culture.

Autres types de bactéries

Le résultat de l'examen direct n'a guère de valeur si l'on trouve différentes espèces mélangées. Il peut s'agir de germes pathogènes ou non, comprenant notamment:

- des streptocoques (a)
- des pneumocoques (b)
- des diplocoques Gram négatifs (*Neisseria*) (c)
- des bacilles Gram négatifs (d)
- des staphylocoques (e), etc.

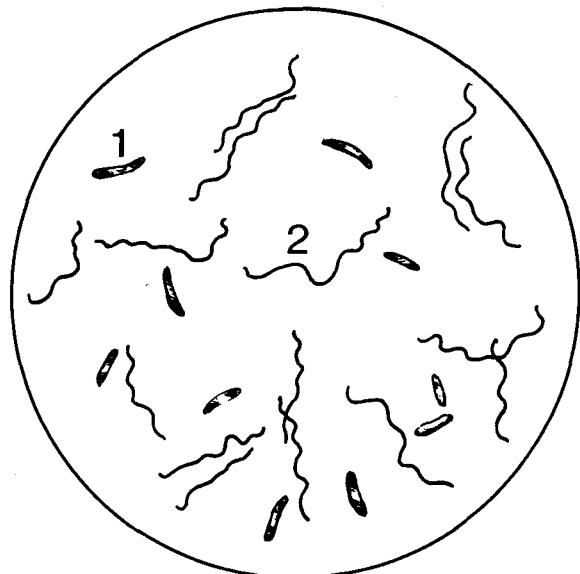
Le rapport contiendra une description détaillée des germes observés (quantité, aspect, réaction au Gram).



Association fuso-spirochétique

Elle est responsable de l'angine ulcéro-nécrotique, dite angine de Vincent. On peut trouver mélangés un grand nombre de germes en quantité égale:

1. *Des bacilles fusiformes*: Gram négatifs, longs, à bouts effilés.
2. *Des spirochètes de Vincent (Treponema vincentii)*: Gram négatifs souvent mal colorés, 10 à 25 µm de long, 5 à 7 spires irrégulières et lâches (souvent terminés en boucle).

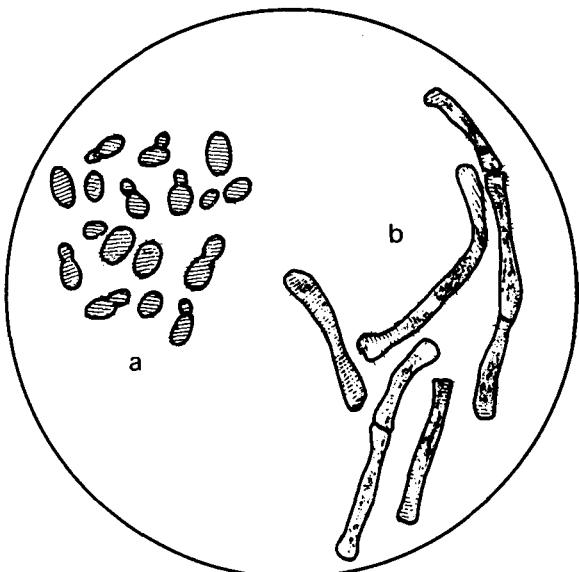


Candida

C'est un champignon responsable du "muguet" ou moniliase (affectant surtout les nourrissons). On trouve:

- (a) *Des levures*: spores ovales ou rondes, de 2 à 4 µm de diamètre, à paroi mince, portant des bourgeons, fortement Gram positives.
- (b) *Des filaments mycéliens*: de longueur variable, de 4 µm de largeur, à bouts arrondis.

Pour mieux observer ces formes, faire un examen à l'état frais en trempant un écouvillon dans du soluté physiologique et en l'examinant entre lame et lamelle.

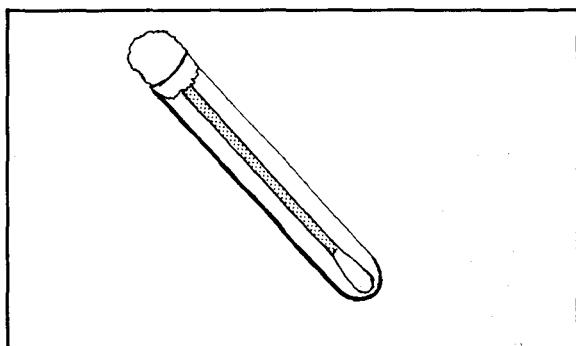


EXPÉDITION DE PRÉLÈVEMENTS DE GORGE (au laboratoire de bactériologie pour mise en culture)

1. Expédition de l'écouvillon seul

Dès que le prélèvement est fait, replacer l'écouvillon dans son tube stérile et l'expédier tel quel au laboratoire de bactériologie.

Conservation: 4 heures maximum.

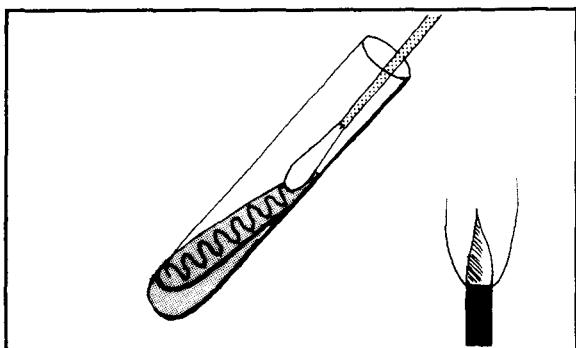


2. Expédition pour recherche du bacille de la diphtérie

(a) Avec un tube de sérum coagulé (ces tubes doivent être conservés au réfrigérateur):

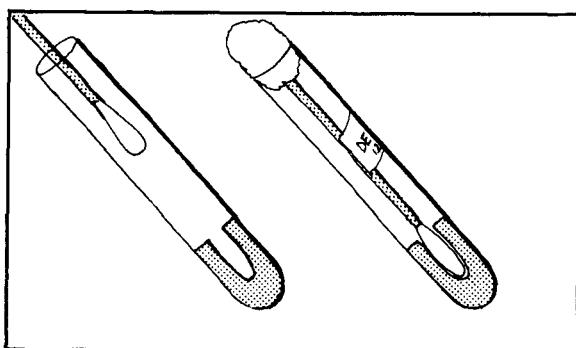
Frotter l'écouvillon sur la surface inclinée du sérum coagulé en partant du fond du tube, et sans appuyer. Expédier le jour même.

Durée de transport maximale: 24 heures.



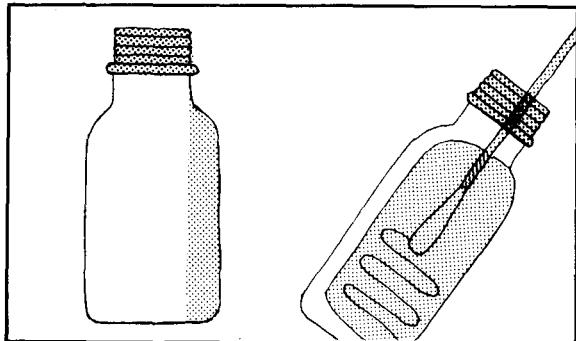
(b) Avec un tube de milieu Loeffler pour "écouvillon contact": Aussitôt après prélèvement, placer l'écouvillon dans le trou cylindrique situé au centre du culot du milieu. Expédier le jour même.

Durée de transport maximale: 24 heures.



3. Expédition pour la recherche du méningocoque

Peu pratiquée, si ce n'est lors d'enquêtes épidémiologiques pour la recherche des porteurs de méningocoque. Utiliser de préférence les milieux Transgrow ou de Stuart (voir page 245).

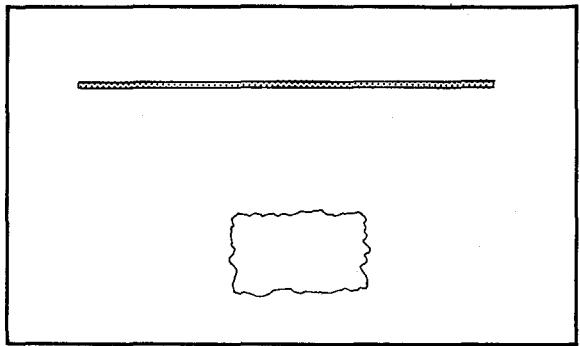


PRÉPARATION DES ÉCOUVILLONS

On devrait de préférence préparer les écouvillons à l'échelon central, en appliquant une technique de détoxicification; si ce n'est pas possible, on peut procéder comme suit:

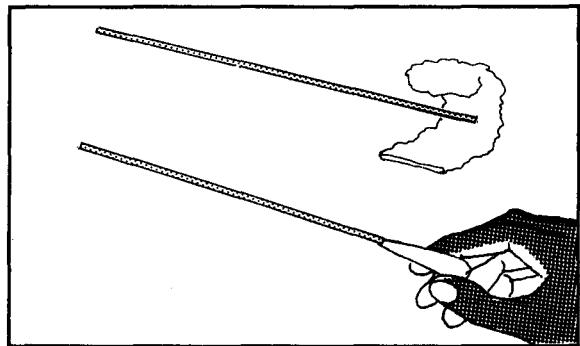
1. Préparer de fines tiges de bois (ou de fil d'aluminium) de 18 cm de long et de 2 mm de diamètre.

Préparer des bandes de coton hydrophile aussi fines que possible, de 6 cm de long sur 3 cm de large.

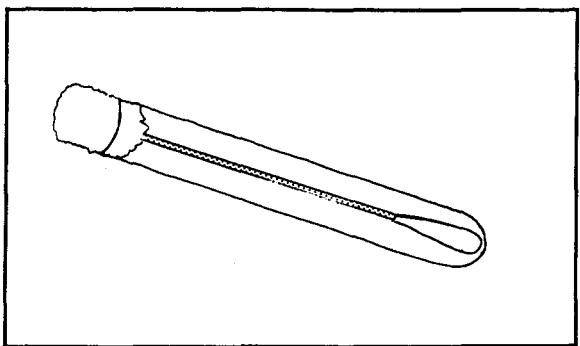


2. Enrouler le coton à une extrémité de la tige. Si on utilise un fil d'aluminium, en aplatisir le bout au préalable.

3. Donner à l'écouvillon une forme conique.



4. Placer dans un tube à essai en Pyrex. Boucher au coton cardé. Stériliser.



38. Examen bactériologique direct des urines

Intérêt

Chez les individus en bonne santé, l'urine ne contient pratiquement pas de germes. On pourra y trouver des bactéries:

- en cas d'infection d'une partie quelconque des voies urinaires (infection de la région basse: urétrite; de la vessie: cystite; du rein: néphrite)
- ou par excretion dans l'urine de bactéries provenant d'une infection localisée dans une autre partie de l'organisme.

Principe de l'examen direct

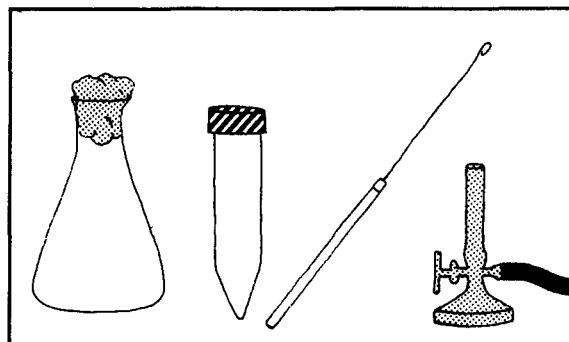
L'urine est centrifugée à grande vitesse. L'examen microscopique des sédiments urinaires, tel qu'il est décrit à la page 325, est indispensable et constitue la partie essentielle de l'analyse. Toutefois, le culot de centrifugation peut aussi servir à effectuer des étalements qui sont:

- séchés et fixés
- colorés au Gram et au Ziehl-Neelsen
- examinés au microscope.

La culture reste toujours indispensable pour identifier exactement les germes trouvés et en déterminer la quantité.

MATÉRIEL – RÉACTIFS

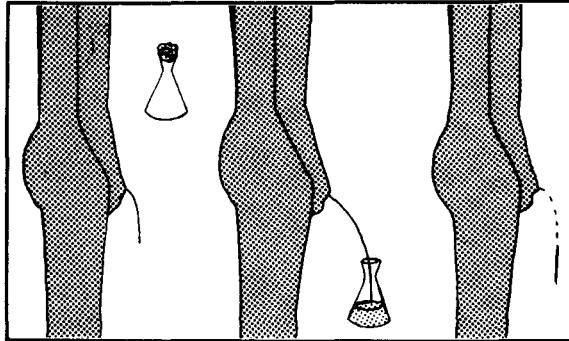
- Erlenmeyer stérile de 250 ml, avec bouchon
- Centrifugeur électrique
- Tubes coniques à centrifuger, stériles, avec bouchons
- Lames
- Anses de platine
- Bec Bunsen
- Réactifs nécessaires pour coloration de Gram (voir page 235) et de Ziehl-Neelsen (voir page 249).



OBTENTION DES URINES

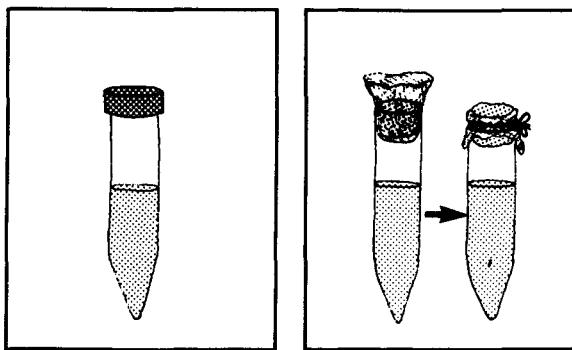
Une toilette locale préalable est nécessaire (voir instructions page 306).

Recueillir l'urine *du milieu du jet* dans l'rlenmeyer stérile. Examiner au plus vite. (On peut aussi employer un tube conique simplement rincé à l'eau bouillante et faire l'examen immédiatement.)

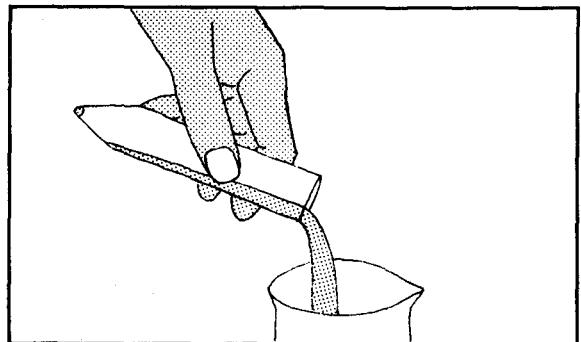


MÉTHODE

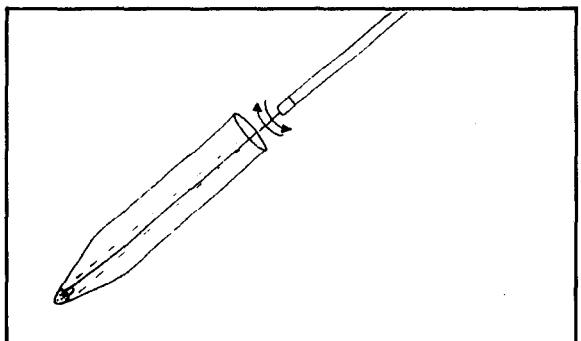
1. Dans un tube stérile, fermé soit par un bouchon vissé, soit par un tampon de coton stérile fixé avec de la gaze et du fil, centrifuger:
 - 10 ml d'urine fraîche pendant 10 minutes, à vitesse moyenne.



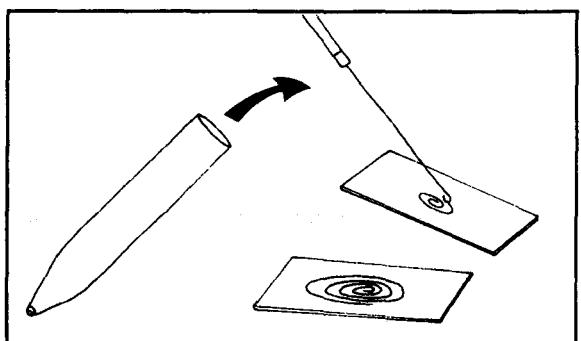
2. Rejeter l'urine surnageante.



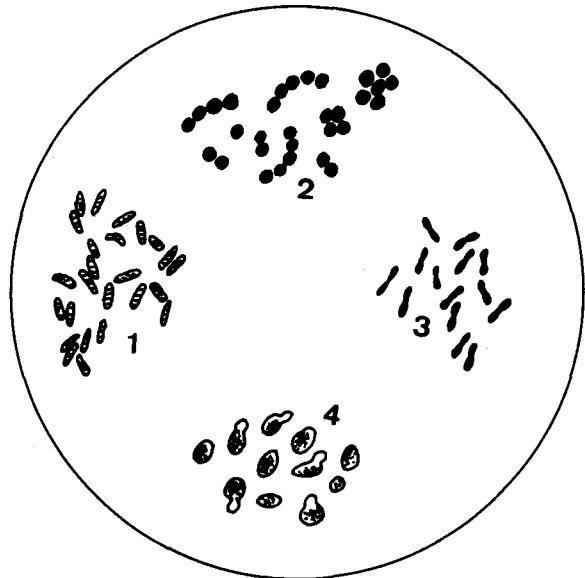
3. Mélanger le culot à l'aide d'une anse de platine (préalablement flambée) jusqu'à obtention d'une suspension homogène.



4. Faire 2 étalements. Laisser sécher les 2 lames.
Fixer par flambage à l'alcool (ou par simple chauffage).



5. Colorer:
lame 1 — au Gram (voir page 235)
lame 2 — au Ziehl-Neelsen (voir page 249).



Examiner au microscope (objectif 100 x, à immersion).

Y-a-t-il du pus? nombreux leucocytes colorés en rouge par le Gram.

Y-a-t-il des bactéries? on peut voir:

1. des bacilles Gram négatifs
2. des coques Gram positifs
3. des bacilles diptérimorphes, Gram positifs
4. des levures Gram positives.

Voir la description de ces germes à la page 239.

Pour la recherche des bacilles tuberculeux: voir ci-après.

NOTATION DES RÉSULTATS

Indiquer s'il y a des leucocytes ou du pus. Donner une description précise des germes observés.

Exemple

Nombreux leucocytes

Quelques hématies

Quelques cellules épithéliales

Nombreux coques Gram positifs, en amas.

Ou

Quelques leucocytes

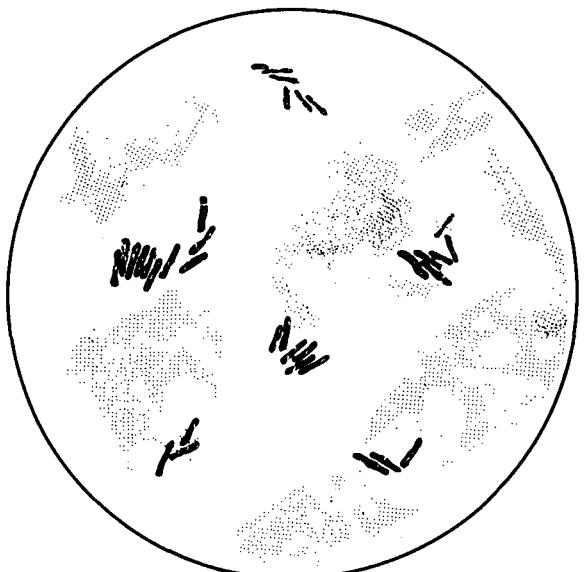
Rares hématies

Quelques cellules épithéliales

Quelques bacilles Gram négatifs.

Gonocoques

Ne jamais faire un diagnostic de gonocoques d'après un examen bactériologique direct du culot de centrifugation des urines. Les rechercher dans le pus urétral (voir page 243).



BACILLES TUBERCULEUX

Ils sont recherchés sur une lame colorée au Ziehl-Neelsen.

Si la recherche des bacilles tuberculeux est spécialement demandée:

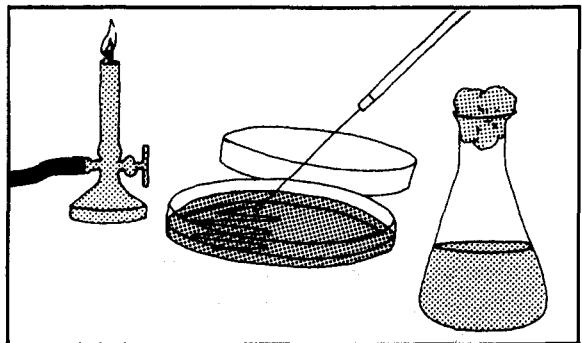
- centrifuger 10 ml d'urine pendant 20 minutes, à grande vitesse.

Les bacilles se colorent en rouge foncé.

Ils sont disposés en rangs.

URO-CULTURES

On ensemence des milieux de culture sélectifs à l'aide du culot urinaire. Une autre technique simple a été récemment mise au point; elle utilise l'examen microscopique direct après coloration au Gram de l'urine qui n'a pas été centrifugée. On notera le nombre de leucocytes, ainsi que la réaction des bactéries à la coloration de Gram. Le tableau ci-après indique la façon d'interpréter les résultats.



Leucocytes*	Bactéries	Interprétation possible
> 3	Coques Gram positifs ou bacilles Gram négatifs	Présence d'une infection des voies urinaires
< 3	Bacilles Gram positifs ou flore mélangée	Echantillons contaminés ou peu frais
< 3	Coques Gram positifs ou bacilles Gram négatifs mais pas mélangés	Bactériurie sans pyurie
> 3	Aucune	Infection des voies urinaires après thérapie antibactérienne — tuberculose — mycoplasme

* Au fort grossissement, objectif 40x.

Cette méthode est indispensable:

- pour identifier l'espèce de bactéries
- pour déterminer la quantité de bactéries présentes (cette quantité est très faible, s'il s'agit d'une contamination du prélèvement par une souillure)
- pour détecter les bactéries en petite quantité
- pour choisir l'antibiotique le plus efficace pour traiter le malade (antibiogramme).

39. Prélèvement d'eau pour analyse bactériologique

Principe

Il faut effectuer différentes analyses bactériologiques pour savoir si une eau est potable. Ces analyses visent à identifier les bactéries qui souillent l'eau et à en déterminer le nombre. Elles sont généralement faites dans les laboratoires spécialisés.

Les techniciens des laboratoires périphériques doivent être capables de prélever dans de bonnes conditions l'eau à analyser et de l'expédier au laboratoire compétent (bactériologie, santé publique, etc.).

Le prélèvement doit être fait dans des conditions d'asepsie, pour qu'aucun germe extérieur supplémentaire ne vienne souiller l'eau.

MATÉRIEL

- Flacon de 250 ml en verre blanc à bouchon à l'émeri, rincé à l'eau distillée
- Papier d'emballage
- Ficelle
- Solution de thiosulfate de sodium à 3% (réactif No. 52)
- Coton
- Alcool à 70%
- Thermomètre 0-50°C.

L'échantillon peut être prélevé:

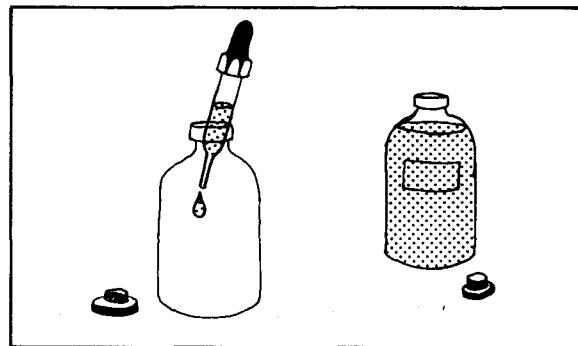
- au robinet
- au puits
- dans une source d'eau à l'air libre, telle que lac ou cours d'eau.

MÉTHODE

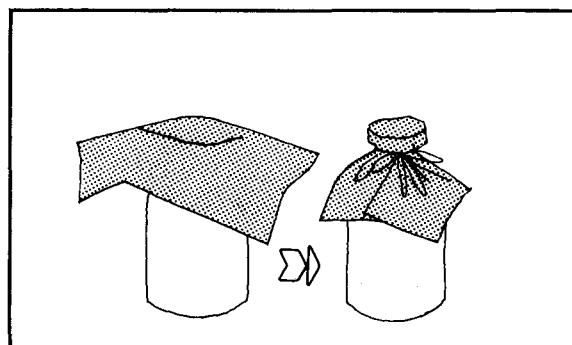
Prélèvement d'eau du robinet

A. Préparatifs

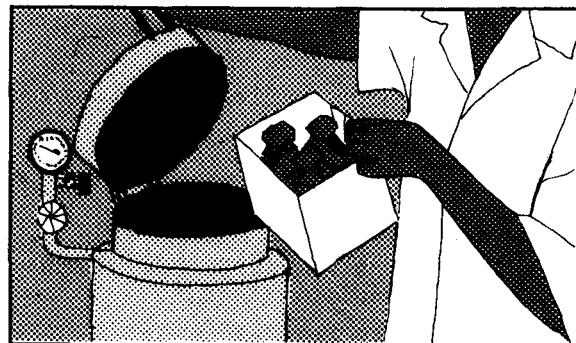
1. Mettre dans un flacon de prélèvement de 250 ml:
 - 2 gouttes de solution de thiosulfate.



2. Placer le bouchon à l'émeri. Le recouvrir avec un carré de papier d'emballage que l'on fixera fermement au goulot avec de la ficelle.

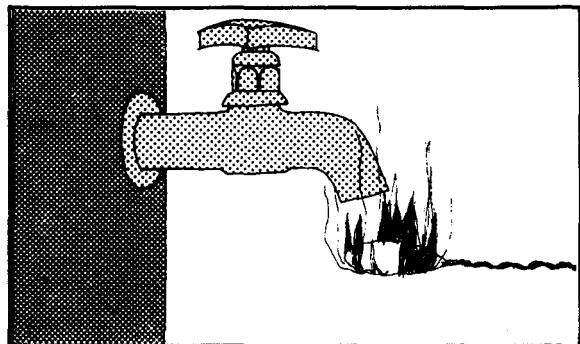


3. Stériliser à l'autoclave pendant 30 minutes, à 120°C, à une pression d'environ 100 kPa (environ 1 atm, 1 kgf/cm², ou 15 lbf/in²).

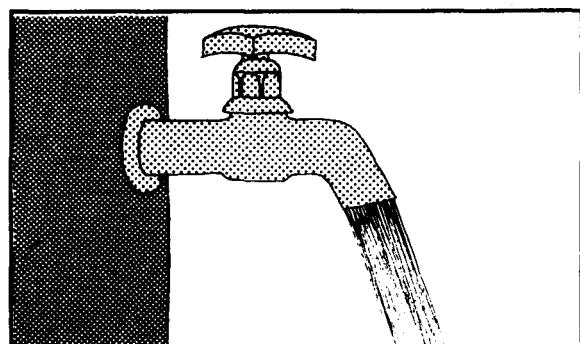


B. Prélèvement de l'échantillon

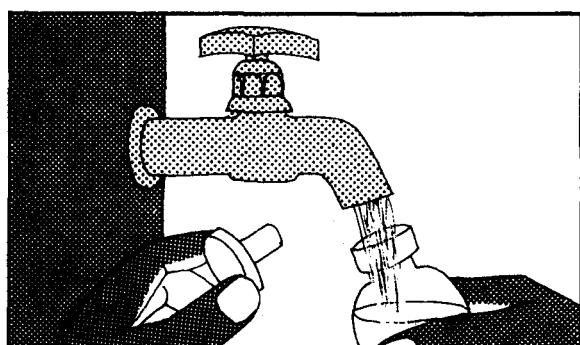
1. Tremper un écouvillon dans de l'alcool à 70%.
Désinfecter le robinet, en tenant dessous l'écouvillon enflammé.



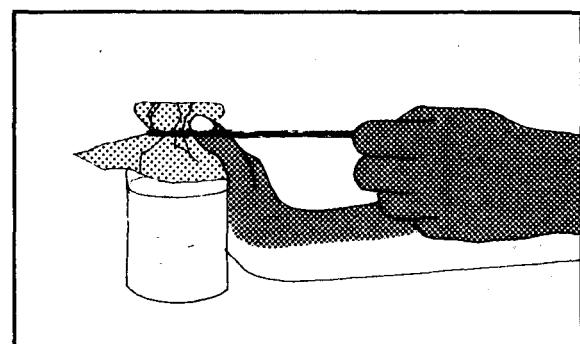
2. Ouvrir le robinet et laisser couler l'eau pendant 2 minutes.



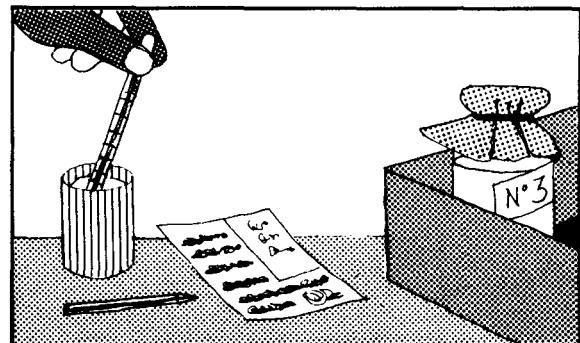
3. Avec la main gauche, déboucher le flacon. Avec la main droite, le placer sous le jet et le remplir d'eau aux 3/4.



4. Reboucher aussitôt le flacon et remettre le papier protecteur du bouchon en le ficelant autour du goulot.



5. Remplir la fiche de renseignements (modèle page 284). Si possible, prélever un 2ème échantillon et mesurer la température de l'eau.
Emballer le flacon en position debout.

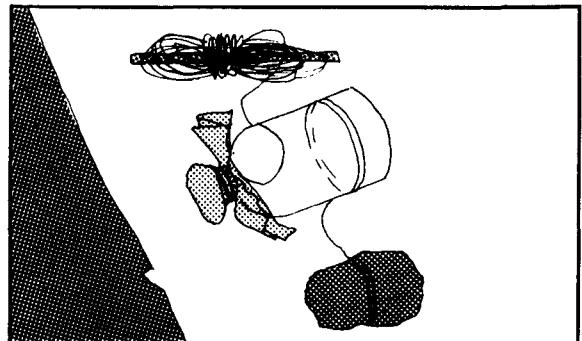


Prélèvement d'eau de puits

A. Préparatifs

1. Attacher un gros caillou avec une ficelle au corps du flacon.

Fixer au goulot du flacon une pelote de ficelle de 20 mètres environ, enroulée autour d'un petit bâtonnet.



2. Emballer le bouchon dans du papier et le ficeler au goulot.

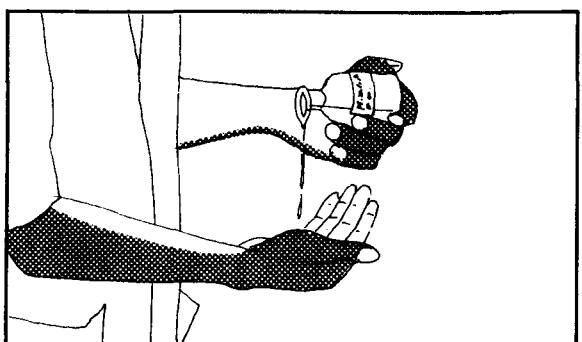
Emballer le tout dans une grande feuille de papier et le stériliser à l'autoclave pendant 30 minutes, à 120°C.

B. Prélèvement de l'échantillon

1. Près du puits, ouvrir le paquet stérile, sans toucher le contenu.

Se frictionner les mains à l'alcool à 70%.

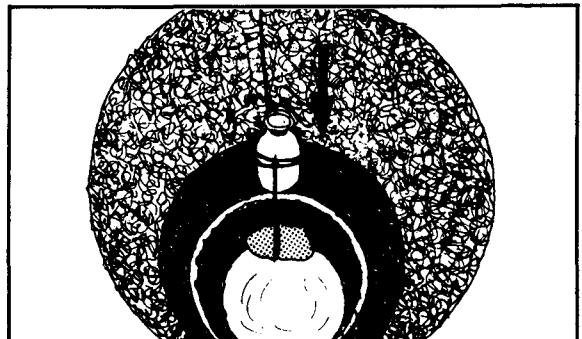
Déboucher le flacon et poser le bouchon sur le papier stérile.



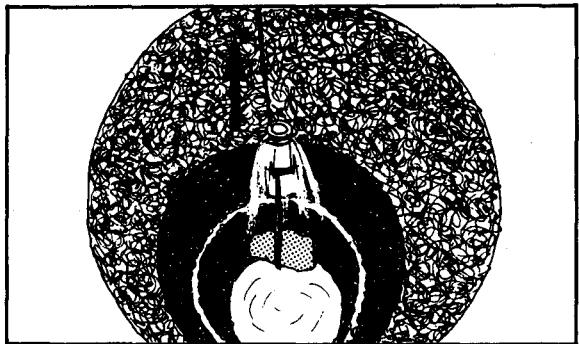
2. Faire descendre le flacon (lesté du caillou dans le puits en dévidant lentement le peloton de ficelle). Le flacon ne doit pas toucher les parois du puits.



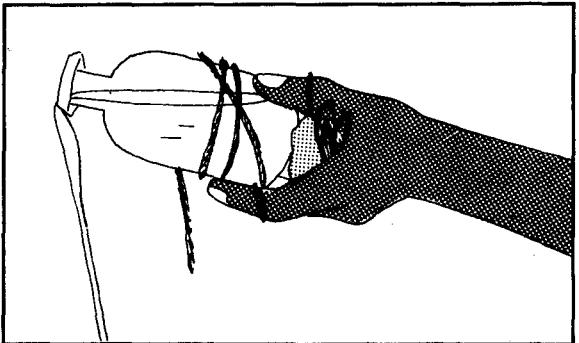
3. Immerger complètement le flacon dans l'eau du puits.



4. Remonter le flacon rempli, en rebobinant la ficelle.



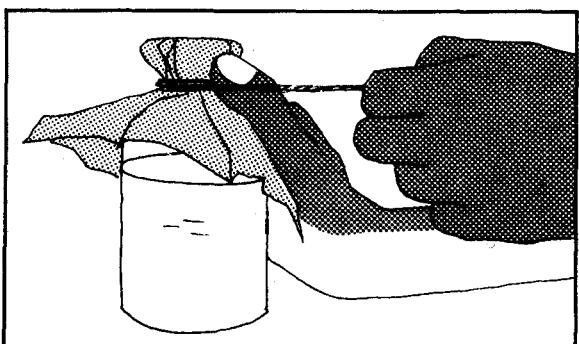
5. Vider le 1/4 supérieur du flacon.



6. Reboucher le flacon.

Remettre le papier protecteur autour du bouchon en le ficelant au goulot.

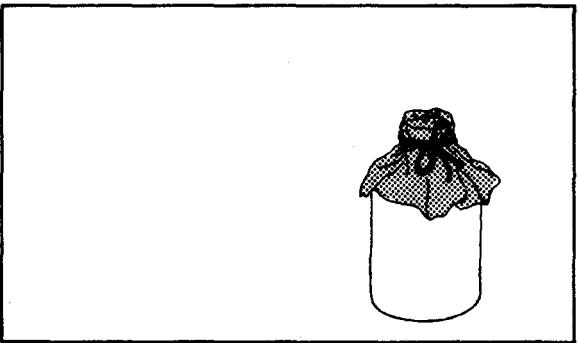
Remplir la fiche de renseignements.



Prélèvement dans des sources d'eau à l'air libre: lacs, cours d'eau, etc.

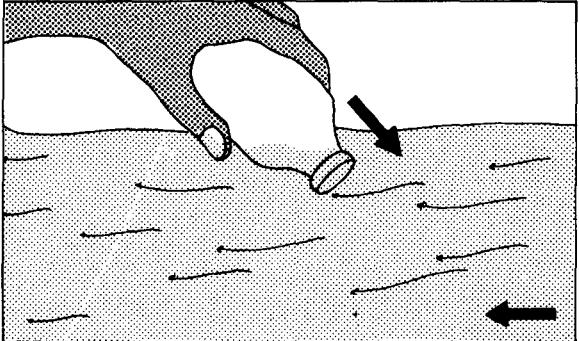
A. Préparatifs

1. On peut utiliser un flacon stérile de 250 ml, sans solution de thiosulfate de sodium.

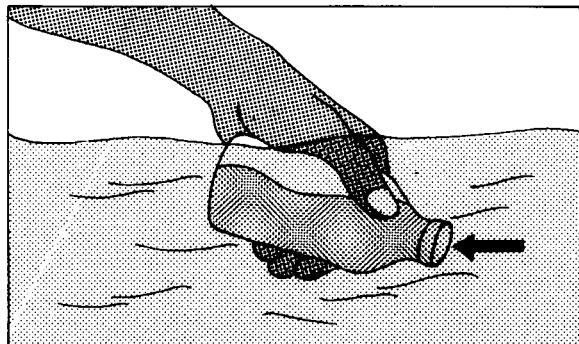


B. Prélèvement de l'échantillon

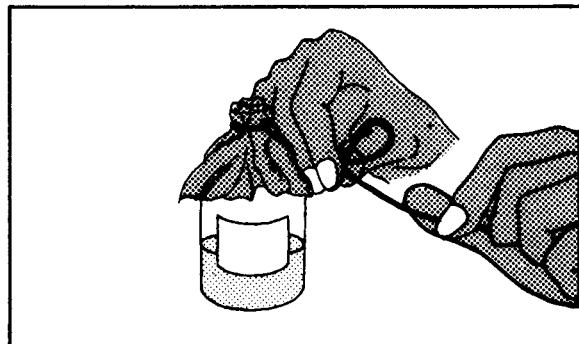
1. Tenir le flacon près du fond et le plonger, le goulot vers le bas, 20 cm environ au-dessous de la surface de l'eau.



2. Tourner le flacon pour le redresser légèrement, l'orifice face au courant éventuel.



3. Une fois le prélèvement effectué, boucher le flacon. Remettre le papier d'emballage autour du bouchon et l'attacher. Etiqueter clairement le flacon et l'expédier sans délai au laboratoire.



Expédition

Expédier le jour même du prélèvement. Ne pas stocker de l'eau prélevée au réfrigérateur avant de l'expédier.

1. Utiliser une caisse en bois:

- avec couvercle
- avec planchette intérieure, évidée pour maintenir les flacons.

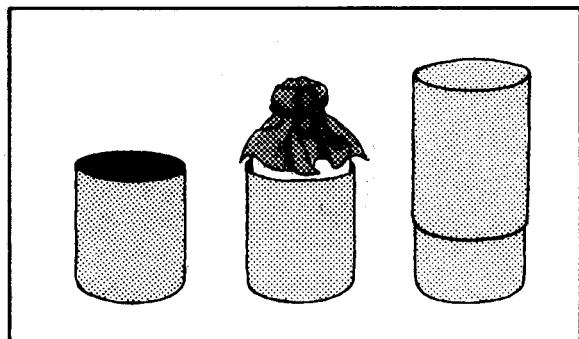
Indiquer sur l'extérieur de la caisse:

HAUT

URGENT

BAS

2. Il existe également des cylindres métalliques spéciaux permettant d'expédier des échantillons d'eau sans risques de déperdition ou de bris de verre.



MODÈLE DE FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Joindre aux échantillons cette fiche, dûment remplie:

Eau prélevée à	(localité)	(endroit exact)				
Source d'approvisionnement:	Robinet	Fontaine à pompe	Puits	Source	Réservoir	Cours d'eau
L'eau est-elle utilisée comme eau de boisson?						
Y-a-t-il des latrines à proximité?	Non	Oui à: mètres				
Température de l'eau*	°C					
<i>Prélèvement effectué par Signature</i>						

*Au lieu de prélèvement. Ne pas mesurer la température de l'eau dans le flacon contenant l'échantillon.

C. SÉROLOGIE

40. Expédition d'échantillons de sérum sanguin et de sang séché pour examen sérologique

Sérum

Les examens sérologiques recherchent la présence dans le sang des anticorps produits par l'organisme en réponse à certaines infections.

On sépare le sérum du sang coagulé par centrifugation. Le sérum doit être conservé stérile.

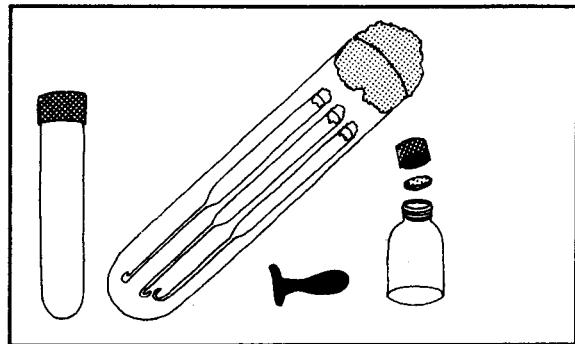
Sang séché

Certaines épreuves sérologiques peuvent être pratiquées sur des gouttes de sang recueilli sur papier-filtre et séché. Juste avant l'épreuve, le sang est absorbé dans un liquide solvant.

SÉRUM

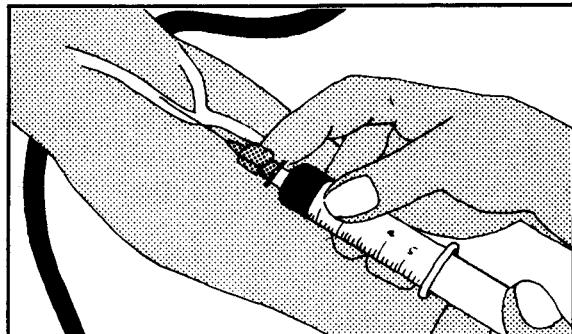
Matériel

- Matériel pour prise de sang
- Centrifugeur
- Tube à centrifuger stérile de 10 ml à fond rond avec bouchon à visser ou en caoutchouc, ou tube Vacutainer stérile, ou seringue sèche stérile
- Pipettes Pasteur stériles
- Tétines
- Pinces
- Flacon stérile de 10 ml avec bouchon à visser hermétique (rondelle de caoutchouc)
- Bec Bunsen.

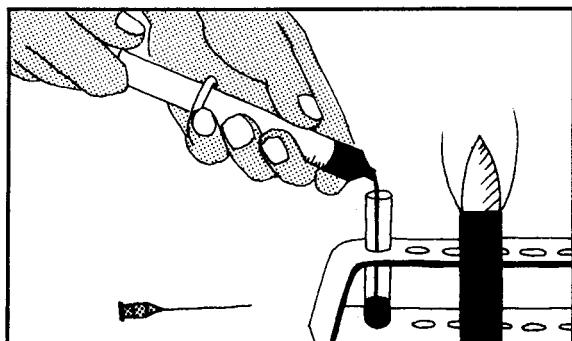


Prélèvement du sérum

1. Prélever 10 ml de sang veineux, au pli du coude.

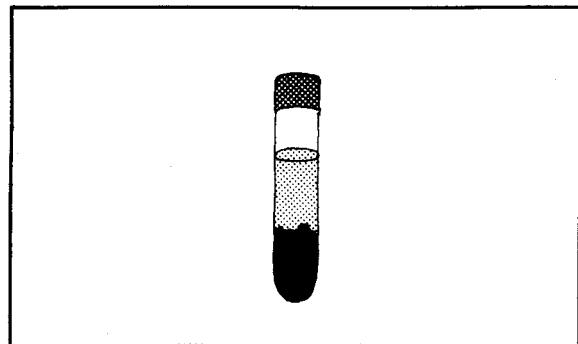


2. Retirer l'aiguille de la seringue. Verser le sang dans un tube à centrifuger que l'on bouche aussitôt.
3. Laisser coaguler à température ambiante.

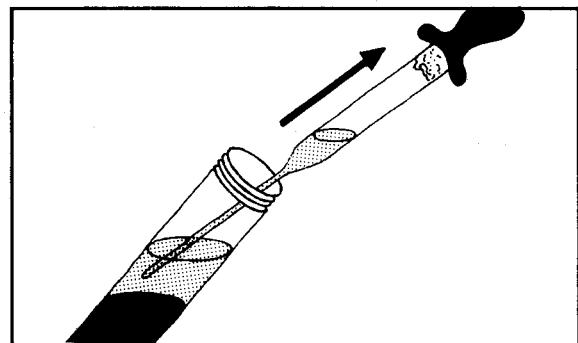


4. Laisser reposer 30 minutes à 2 heures, mais pas au-delà, puis centrifuger pendant 10 minutes à grande vitesse.

Si l'on ne possède pas de centrifugeur, on peut laisser le sang plusieurs heures au réfrigérateur; le caillot se séparera du sérum.

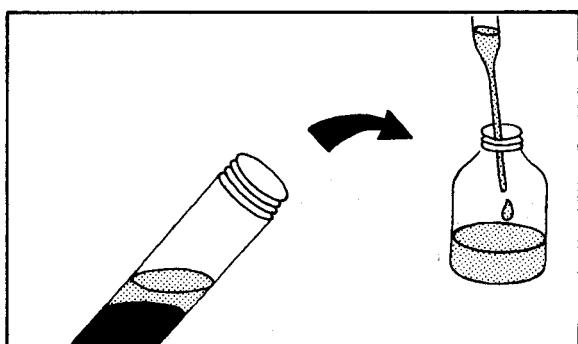


5. Déboucher le tube de sang. Prélever le sérum qui surnage à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.



6. Transvaser le sérum dans un flacon stérile de 10 ml. Reboucher aussitôt.

Pour certains examens sérologiques, on peut ajouter à l'échantillon un antiseptique conservateur (par exemple, du thiomersal)*. Suivre les instructions du laboratoire de référence.

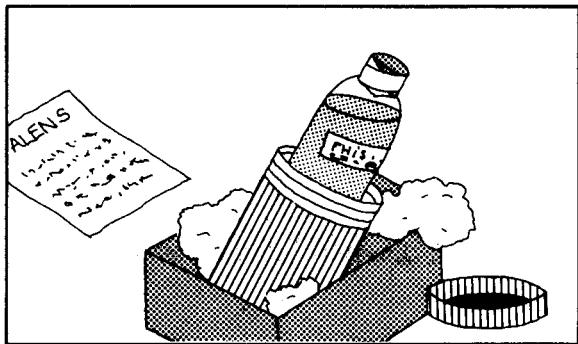


*Appelé également merthiolate ou thimerosal.

Expédition

1. Etiqueter le flacon (nom du malade, date).
2. Fixer le bouchon avec du sparadrap.
3. Envelopper le flacon dans du papier absorbant ou de la gaze.
4. Le mettre dans un récipient en aluminium en l'y calant avec 2 tampons de coton.
5. Placer le récipient dans une boîte en bois ou en carton.
6. S'assurer que le temps de voyage ne dépasse pas 3 jours.

Les échantillons transportés en voiture doivent être placés dans une glacière portative.



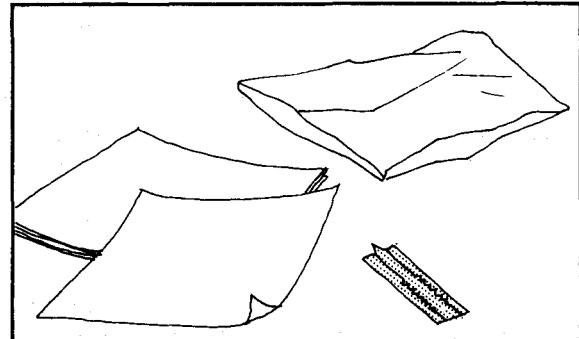
Conservation

Les sérum destinés à la plupart des épreuves sérologiques peuvent être conservés dans le compartiment à glace du réfrigérateur, à -2°C ou à une température inférieure, pendant 1 mois au moins.

PRÉLÈVEMENT ET EXPÉDITION DE SANG SÉCHÉ

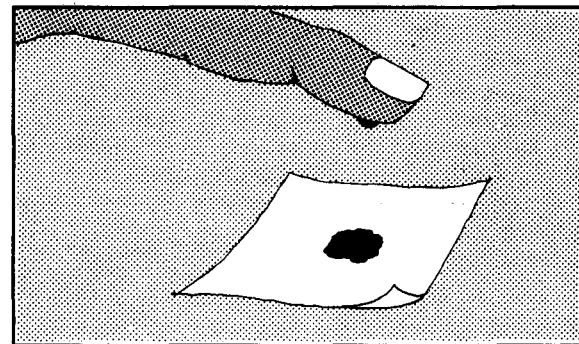
Matériel

- Vaccinostyles stériles
- Papier-filtre Whatman No. 4 (ou, à défaut, papier-filtre léger ordinaire) découpé en petits rectangles d'environ 4 x 3 cm
- Petits sacs en plastique, si possible.



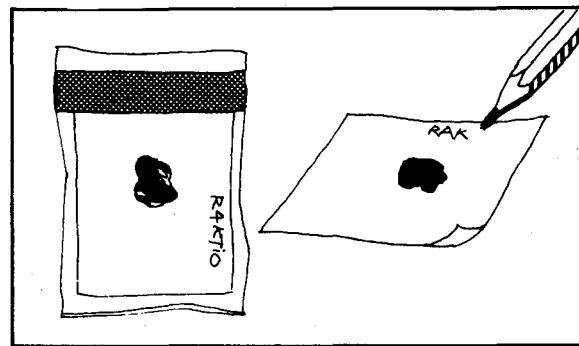
Méthode

1. Prélever du sang capillaire, au doigt, de la manière habituelle (voir page 189).
2. Recueillir une grosse goutte de sang au centre du rectangle de papier. Laisser le papier absorber complètement la goutte de sang. Laisser sécher à l'air.

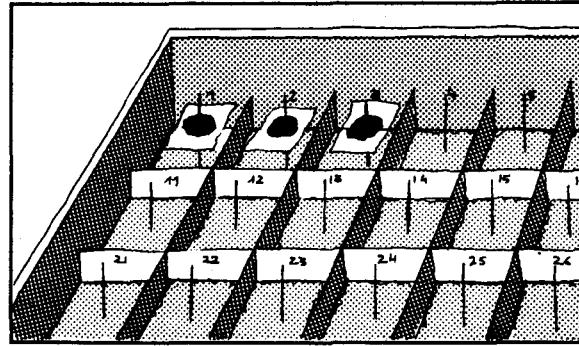


Expédition

Inscrire le nom du malade et son numéro sur le papier. Le placer dans un petit sac en plastique, ou dans une enveloppe ordinaire.



On peut aussi planter les feuilles à l'aide d'épingles sur un petit bloc de mousse plastique, dans une boîte à compartiments numérotés (enquêtes de masse).



Conservation

Au moins 2 à 3 semaines à température ambiante, sous tous les climats.

Utilisation

Le sang séché est utilisé en particulier pour:

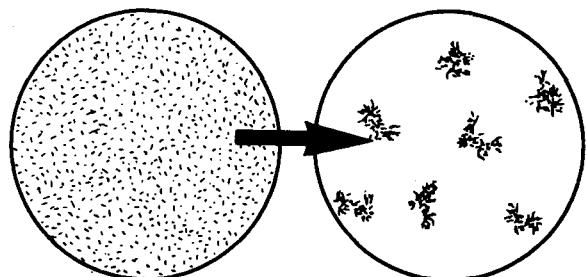
- le sérodiagnostic du pian et de la syphilis (tréponèmes: immuno-fluorescence)
- la recherche des IgM dans la trypanosomiase, etc.

41. Réaction du VDRL

Les initiales VDRL correspondent à Venereal Disease Research Laboratory, laboratoire de recherche sur les maladies vénériennes où la réaction a été mise au point.

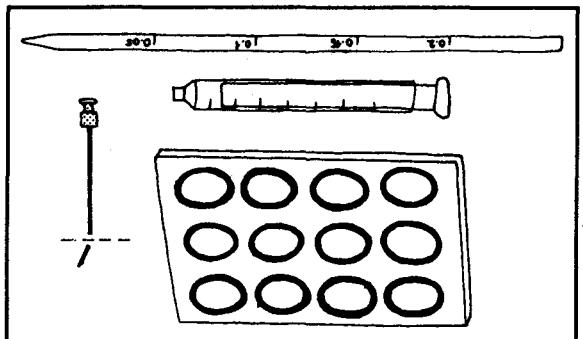
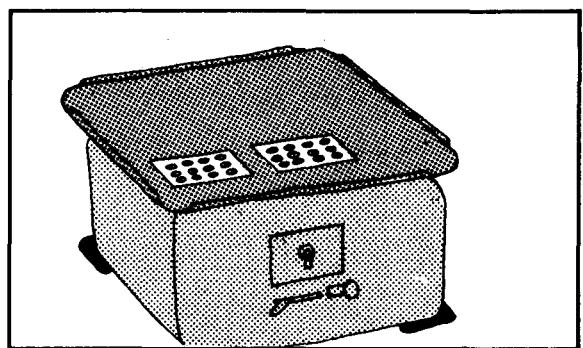
Principe

1. On recherche dans le sérum sanguin la présence de *réagines*, anticorps qui y apparaissent dans les tréponématoses (syphilis, pian, pinta).
2. La présence de ces anticorps est révélée par un antigène lipidique (non tréponémique) qui est une suspension de microparticules.
3. La réaction antigène-anticorps se traduit par une flocculation de cette suspension (micro-agglutination). Dans les pays tropicaux, il est préférable d'effectuer la réaction à une température de 23 à 29°C.



Matériel

- Bain-marie à 56°C
- Agitateur-rotateur (180 tours/minute)
- Microscope (oculaire 4 à 6 x, objectif 10 x avec chariot)
- Plaques de verre pour réaction du VDRL (avec cercles de porcelaine ou de paraffine à fond plat, de 14 mm de diamètre)
- Seringue de 2 ml (de type "à insuline")
- Aiguille spéciale sans biseau donnant 60 gouttes par ml (aiguille 18 G (1,2 mm) sciée à son extrémité, ou pipette Pasteur capillaire calibrée donnant 60 gouttes/ml)
- Pipettes de 0,2 ml avec graduations de 0,05 ml (ou pipettes de 1,0 ml graduées au 1/100)
- Béchers.



Réactifs

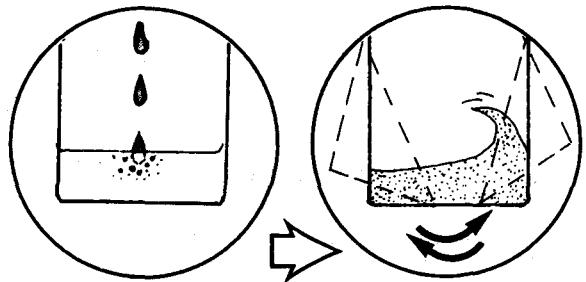
Suspension antigénique VDRL préparée le jour même.

Sérum réactif connu: témoin positif et faiblement positif

Sérum non réactif connu: témoin négatif.

Préparation de la suspension antigénique pour la réaction du VDRL

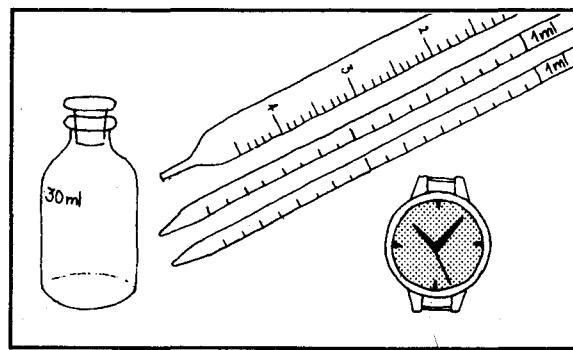
1. L'antigène est une solution alcoolique de lipides (cardiolipine et lécithine) et de cholestérol, produits qui ne sont pas solubles dans l'eau.
2. On prépare la suspension antigénique en mélangeant l'antigène pur avec de la solution tampon pour VDRL. Les graisses sont précipitées au contact de l'eau sous forme de microparticules qui se mettent en suspension lorsqu'on agite le liquide. La solution doit recouvrir tout le fond du flacon.



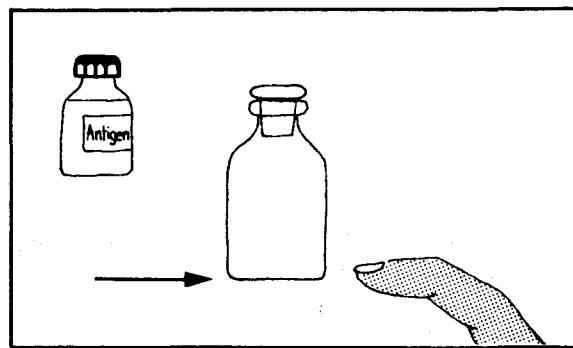
Matériel pour la préparation de la suspension antigénique

- Flacon de 30 ml à col étroit, avec bouchon émeri, diamètre du fond 35 mm
- 1 pipette graduée de 5 ml
- 2 pipettes graduées de 1 ml
- Montre avec trottouille-secondes
- Antigène VDRL
- Solution tampon pour VDRL généralement fournie avec l'antigène (réactif No. 55).

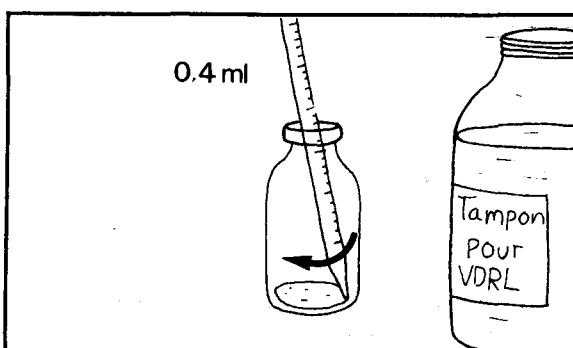
Examiner l'antigène par transparence. S'il contient des particules ou des précipités, ne pas l'utiliser.



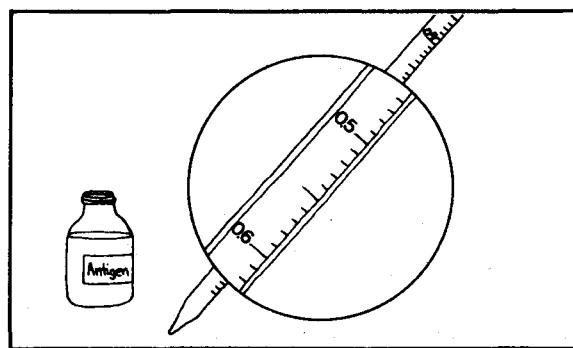
1. S'assurer que le fond du flacon est parfaitement plat. Sinon, en prendre un autre.



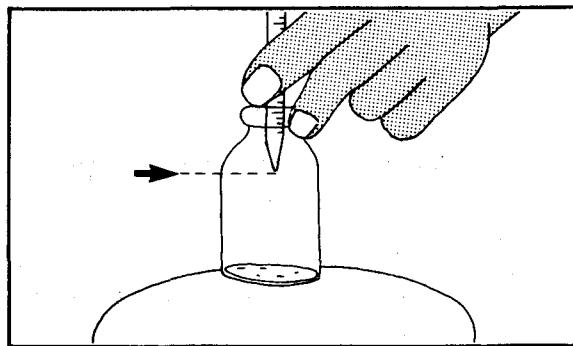
2. A l'aide d'une pipette de 1 ml, mesurer 0,4 ml de solution tampon pour VDRL, en procédant comme suit:
 - poser la pointe de la pipette contre le fond du flacon
 - laisser couler la solution dans le flacon.



3. A l'aide d'une pipette de 1 ml, mesurer 0,5 ml d'antigène dans la partie inférieure d'une pipette de 1 ml graduée jusqu'au bout. S'assurer que l'antigène mesuré dans la pipette est parfaitement *l'impide* (*pas précipité*).

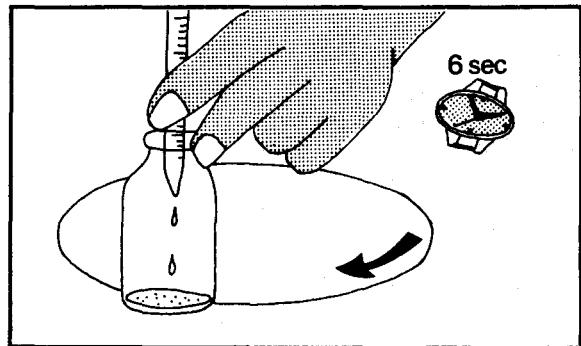


4. Tenir la pipette bien bouchée et la placer dans le flacon, la pointe au 1/3 supérieur du flacon.
5. Commencer à faire tourner le flacon bien à plat sur le dessus du plan de travail.



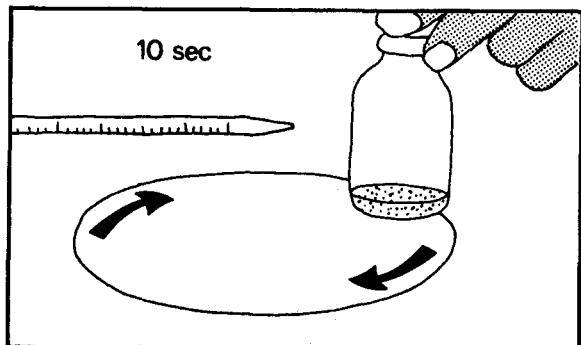
6. Tout en continuant à tourner, relâcher doucement la pression du doigt qui bouche le haut de la pipette pour laisser tomber les 0,5 ml d'antigène *goutte à goutte, sans éclabousser.*

(L'opération doit prendre environ 6 secondes, soit 18 à 20 tours d'un cercle de 5 cm de diamètre.)



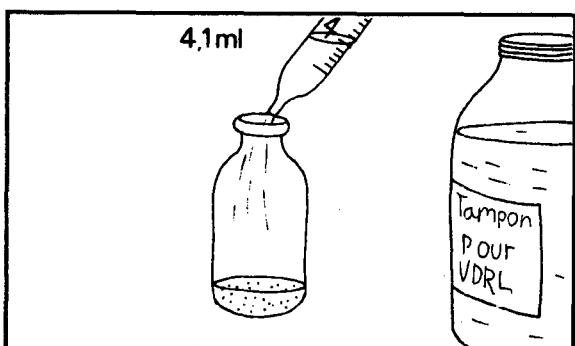
7. Souffler la dernière goutte d'antigène (sans toucher la solution avec la pipette).

Continuer à faire tourner le flacon à plat pendant 10 secondes.



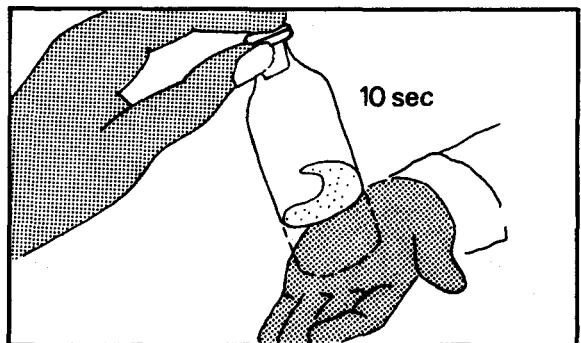
8. Ajouter aussitôt avec la pipette de 5 ml:

– 4,1 ml de solution-tampon pour VDRL.



9. Boucher le flacon avec son bouchon-émeri. Secouer le flacon de haut en bas contre la main environ 30 fois pendant 10 secondes.

La suspension antigénique est prête à l'emploi et doit être utilisée le jour même.



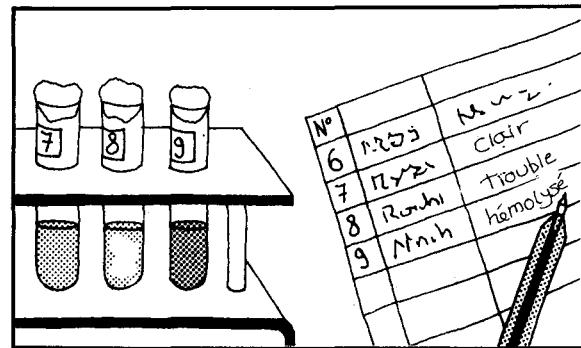
Essai préliminaire de la suspension antigénique

1. Les sérums-témoins de réactivité graduée (réactifs avérés, faiblement réactifs, non réactifs) sont comparés à la suspension antigénique.
2. Les réactions effectuées à l'aide de sérums-témoins devraient produire la réactivité attendue. Le sérum non réactif devrait faire apparaître une dispersion totale des particules d'antigène.
3. Ne pas utiliser de suspension antigénique non satisfaisante.

A. RÉACTION DU VDRL: ÉPREUVE QUALITATIVE

1. Observer si le sérum à examiner est:

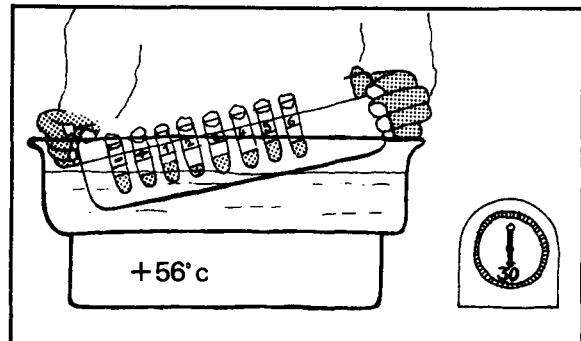
- clair
- trouble
- hémolysé (rose; ne pas l'utiliser).



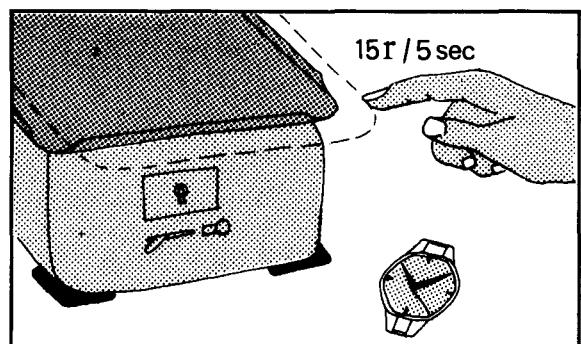
2. Amener le bain-marie à 56°C.

Y placer les tubes (bouchés au coton cardé et numérotés) pendant 30 minutes au bain-marie.

Examiner tous les sérums quand on les sort du bain-marie et centrifuger à nouveau ceux qui présentent un culot.



3. Pendant ce temps, contrôler la vitesse du rotateur: 180 rotations/minute, soit 15 rotations pour 5 secondes.

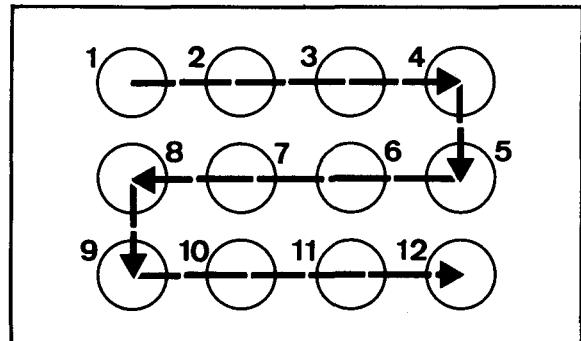


4. Numéroter les cercles de la plaque VDRL au crayon gras, ou au diamant, en suivant le sens indiqué sur le schéma ci-contre.

Noter les correspondances des numéros des sérums et des numéros des cercles.

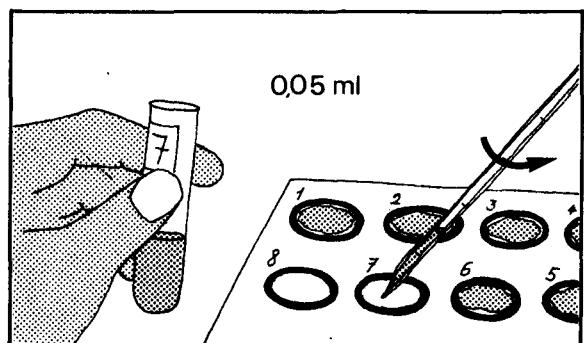
Par exemple:

Soluté physiologique: cercle 1
Sérum-témoin négatif: cercle 2
Sérum-témoin positif: cercle 3.



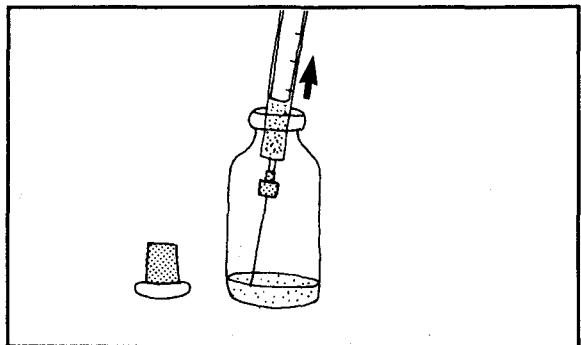
5. Laisser refroidir les sérums jusqu'à température ambiante avant de commencer l'épreuve (15 minutes après sortie du bain-marie).

6. A l'aide d'une pipette, déposer dans chaque cercle:
 - 0,05 ml du sérum correspondant.

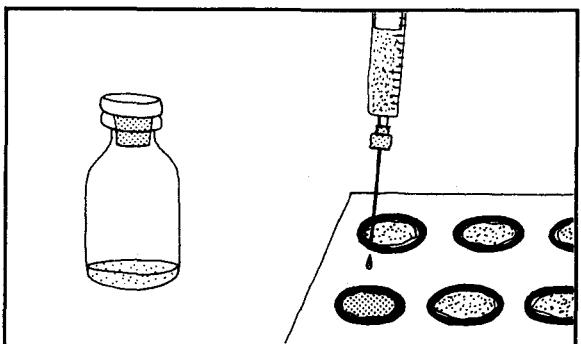


7. Agiter légèrement le flacon de suspension antigénique et aussitôt, d'un seul mouvement, aspirer dans la seringue 0,5 ml de suspension antigénique, à l'aide de l'aiguille spéciale 18 G.

Laisser retomber la 1ère goutte de la seringue dans le flacon.

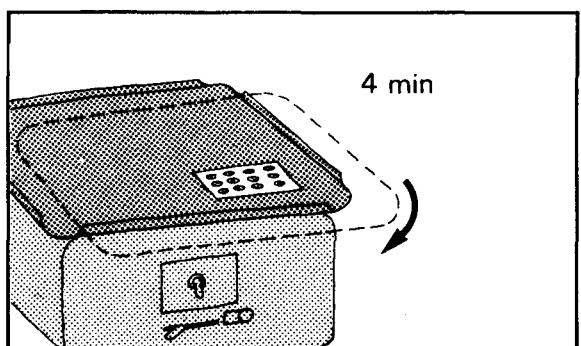


8. Déposer 1 goutte de suspension sur chaque cercle avant le sérum.



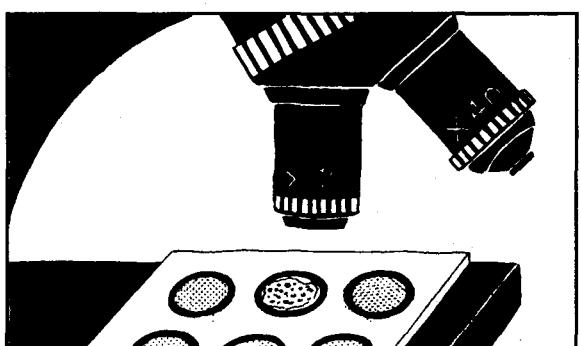
9. Placer aussitôt sur le rotateur et faire tourner 4 minutes.

On peut aussi faire tourner la plaque à la main, sur une surface plane, à la même vitesse.



10. Dès que les 4 minutes sont écoulées, mettre la plaque sur la platine du microscope.

Examiner les cercles en suivant l'ordre numérique et en utilisant l'objectif 10 x (oculaire 10 x).



Lecture microscopique

Sérum non réactif (NR)

On observe une suspension homogène de particules ressemblant à des aiguilles fines et courtes.

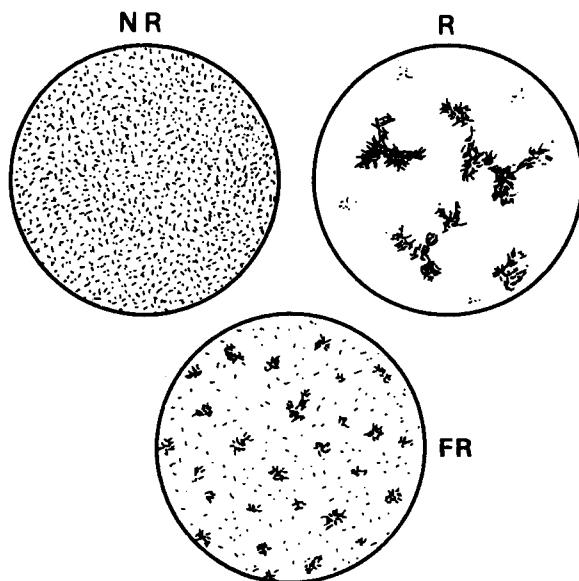
Sérum réactif (R)

Paquets d'aiguilles relativement gros, sur un fond clair.

Sérum faiblement réactif (FR)

Nombreux petits agglutinats, sur un fond encore chargé de quelques aiguilles dispersées qui n'ont pas été agglutinées. Vérifier cette faible réaction par un VDRL quantitatif.

On constate parfois une réaction prozone. Elle se produit quand un sérum pur empêche la réactivité et que la réactivité maximale ne se produit qu'avec du sérum dilué; ainsi un résultat faiblement réactif ou non réactif au VDRL qualitatif peut correspondre à un sérum fortement réactif quand il est dilué. Aussi tous les sérum faiblement réactifs devraient-ils être soumis au VDRL quantitatif avant notation des résultats.



Noter les résultats comme suit

VDRL épreuve qualitative:

- sérum réactif
- sérum non réactif
- sérum faiblement réactif.

En cas de syphilis:

l'épreuve du VDRL donne généralement des résultats positifs:

- 3 semaines après l'apparition du chancre primaire, soit:
- 6 semaines après le contact infectant.

Attention: faux résultats positifs

Des réagines peuvent exceptionnellement être trouvées chez des individus non atteints de tréponématoses et qui montreront cependant un VDRL positif. Aussi est-il conseillé de faire le VDRL quantitatif pour tous les séums trouvés réactifs.

B. VDRL – ÉPREUVE QUANTITATIVE

Procéder à une épreuve quantitative pour tous les sérums qui donnent des résultats réactifs ou faiblement réactifs à l'épreuve qualitative. Les dilutions à étudier sont: sérum pur (1:1), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 et 1:32. On peut faire deux réactions sur une seule lame.

Matériel

Matériel supplémentaire pour l'épreuve quantitative:

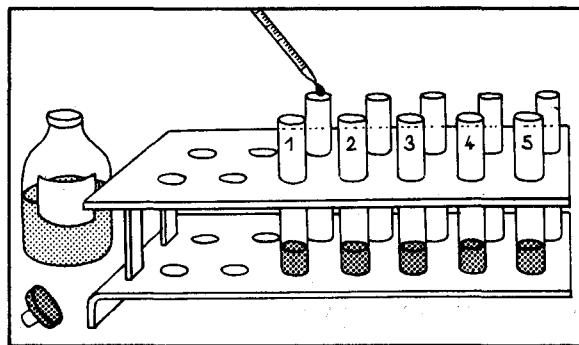
- Tubes à essai et portoirs
- Pipettes graduées de 0,2 ml, avec graduations de 0,01 ml
- Pipettes graduées de 1,0 ml
- Aiguille 19 G (1,0 à 1,1 mm) sans biseau (doit donner 75 gouttes de suspension antigénique par millilitre quand seringue et aiguille sont tenues

verticalement — à vérifier pour chaque aiguille avant le début de l'épreuve)

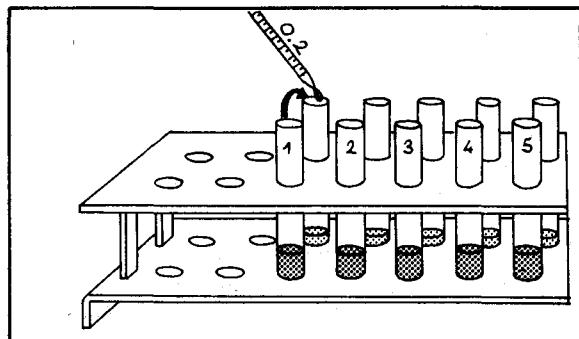
- Aiguille 23 G (0,6 mm) sans biseau (doit donner 100 gouttes de soluté physiologique par millilitre quand seringue et aiguille sont tenues verticalement — à vérifier pour chaque aiguille avant le début de l'épreuve)
- Soluté physiologique.

Méthode

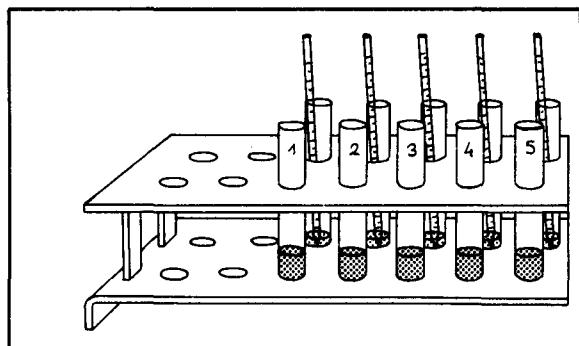
1. Placer les tubes de sérum à étudier dans la première rangée de trous du portoir, en mettant immédiatement derrière chacun un tube contenant 0,7 ml de soluté physiologique.



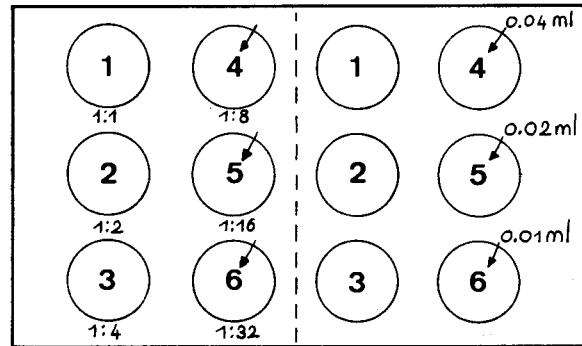
2. Préparer une dilution 1:8 de chaque sérum:
 - ajouter 0,1 ml de sérum aux tubes contenant 0,7 ml de soluté physiologiqueUtiliser une pipette de 0,2 ml graduée en subdivisions de 0,01 ml.



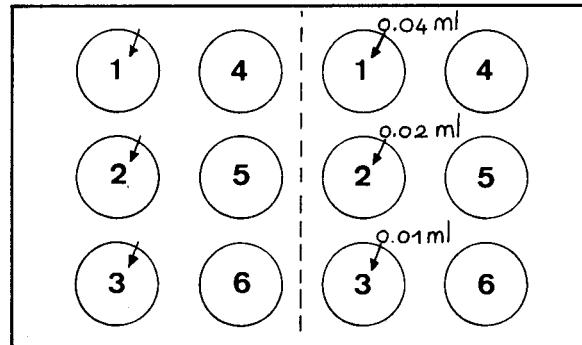
3. Bien mélanger et laisser la pipette dans le tube de dilution jusqu'à ce que toutes les dilutions soient faites.



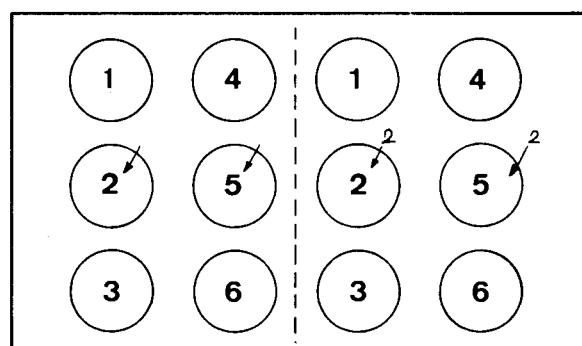
4. En utilisant la pipette du tube de dilution, transvaser 0,04 ml, 0,02 ml et 0,01 ml de la dilution de sérum 1:8 respectivement aux numéros 4, 5 et 6 d'une nouvelle plaque pour VDRL dont les cercles sont numérotés comme illustré ci-contre. Souffler la dilution de sérum restante dans le tube de dilution.



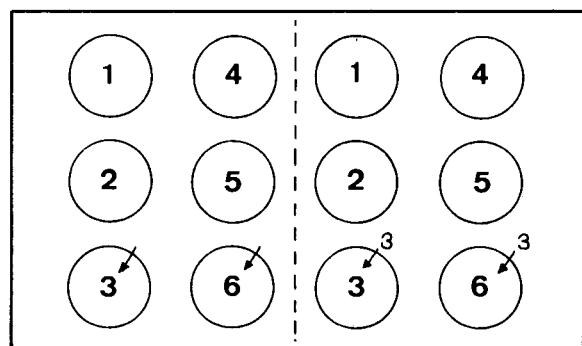
5. Avec la même pipette, ajouter 0,04 ml, 0,02 ml et 0,01 ml de sérum pur aux cercles 1, 2 et 3 respectivement.



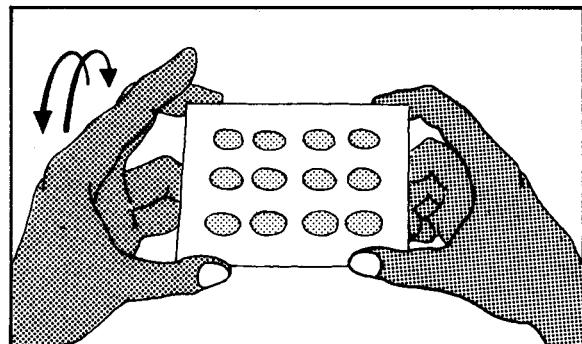
6. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille 23 G, ajouter 2 gouttes de soluté physiologique aux cercles 2 et 5 de chaque sérum.



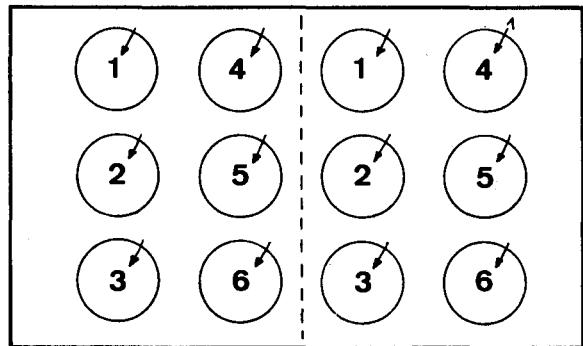
7. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille 23 G, ajouter 3 gouttes de soluté physiologique aux cercles 3 et 6 de chaque sérum.



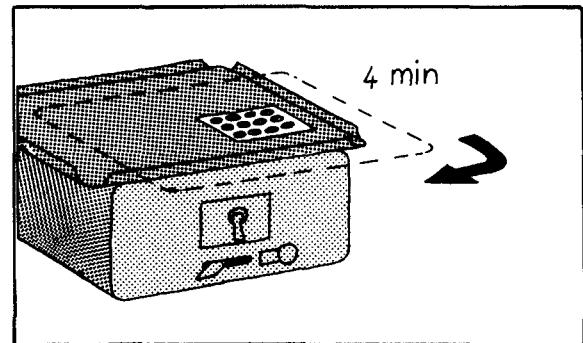
8. Faire tourner délicatement les plaques à la main pendant environ 15 secondes pour mélanger sérum et soluté.



9. A l'aide d'une seringue et de l'aiguille spéciale 19 G, ajouter 1 goutte de suspension antigénique à chaque cercle.



10. Faire tourner les plaques pendant 4 minutes (à 180 t/min.). Lire aussitôt les résultats au microscope.



Résultats

Noter quelle est la dilution la plus grande qui produit un résultat négatif.

Exemple

Sérum pur	Dilutions de sérum				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
R	R	R	F	NR	NR
F	F	R	R	F	NR
NR (pratiquement)	F	R	R	R	NR
F	NR	NR	NR	NR	NR

Dilution 1:4: réactif
 Dilution 1:8: réactif
 Dilution 1:16: réactif
 Sérum pur: faiblement réactif

R = réactif

F = faiblement réactif

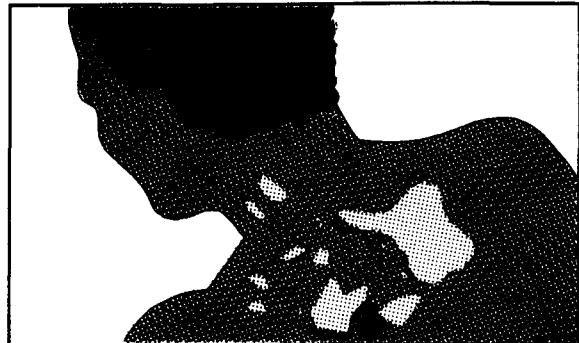
NR = non réactif

D. MYCOLOGIE

42. Pityriasis versicolor : examen direct

Le Pityriasis versicolor est une affection de la peau fréquente dans les pays chauds. Elle est provoquée par un champignon *Pityrosporum furfur*. Le tronc et la face sont recouverts de taches:

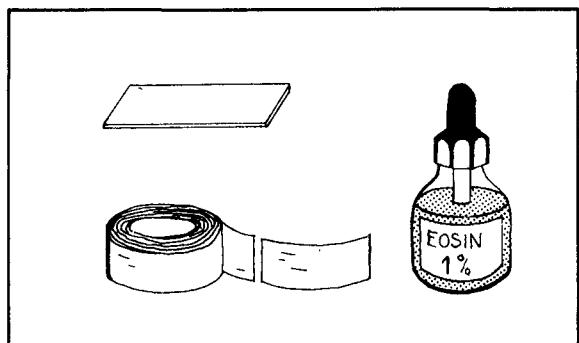
- claires et décolorées chez les sujets de race noire
- jaune-brun chez les sujets de race blanche.



MATÉRIEL

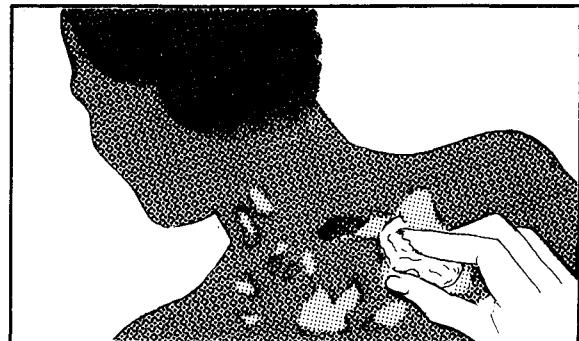
- Ruban adhésif transparent
- Lame
- Pince
- Compresse de gaze.

Si possible, solution aqueuse d'éosine à 1% (réactif No. 23). Sinon, faire l'examen sans coloration.

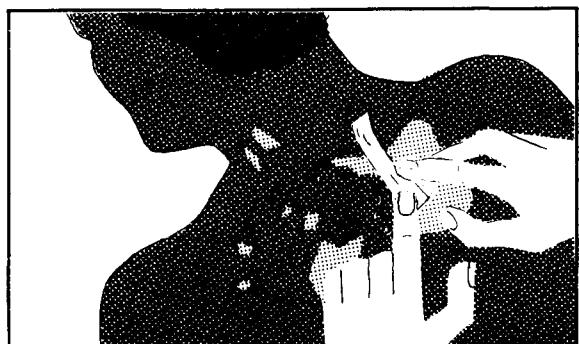


MÉTHODE

1. Repérer une tache de pityriasis bien évolutive. L'humidifier avec une compresse imprégnée de solution d'éosine.
Laisser sécher 1 minute.
(Ne pas prélever si la peau a été talquée. Laver au préalable.)



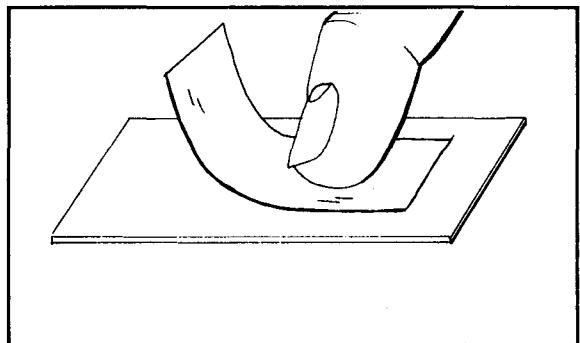
2. Couper un morceau de ruban adhésif de 5 cm environ. Le placer un peu à cheval sur un bord de la tache.



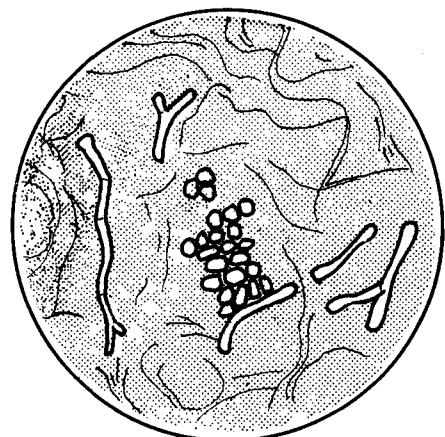
3. Bien appliquer le ruban adhésif sur la peau et appuyer fermement d'un bout à l'autre, plusieurs fois, avec un abaisse-langue ou une baguette de verre.



Retirer le ruban adhésif avec une pince. Le placer aussitôt sur une lame, face collante contre la lame.



Examiner toute la lame au microscope (objectif 40 x) jusqu'à repérer un bouquet de gros granules (les spores). Ils sont blancs, sur le fond de la préparation rose si la peau a été colorée à l'éosine et repérables même dans les préparations non colorées.



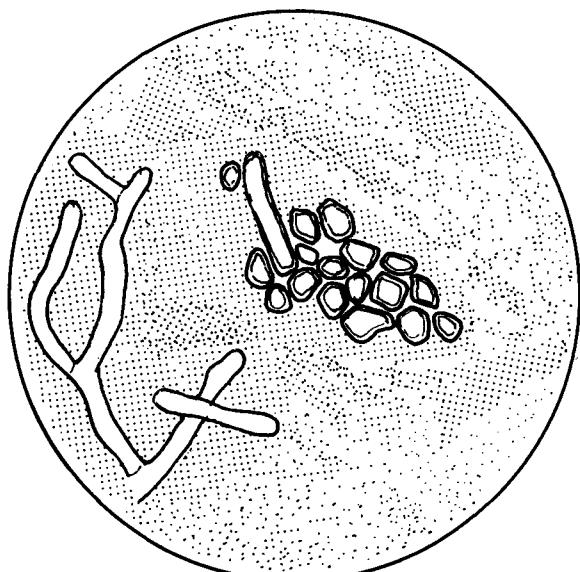
Passer alors à l'objectif à immersion pour voir les détails:

(a) *Spores*:

- en bouquet ou en grappes
- rondes ou un peu rectangulaires
- 3 à 8 μm de diamètre
- à paroi assez épaisse
- bourgeons parfois visibles

(b) *Filaments mycéliens* (plus difficiles à voir):

- longs bâtonnets, déformés et contournés
- 20 à 40 μm de long
- 5 μm de large
- ressemblent à des doigts et portent des ramifications.



NOTATION DU RÉSULTAT

Examen direct du pityriasis versicolor: présence de spores en grappe (et, éventuellement, de filaments mycéliens).

Culture

Elle n'a pas encore pu être réussie.

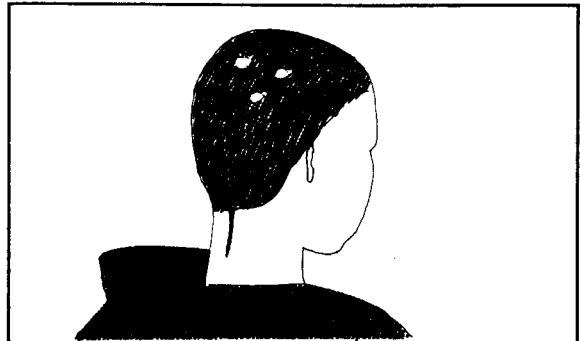
Coloration au Lugol; Le Lugol décape la peau et on retrouve surtout des filaments mycéliens. Cette méthode est donc déconseillée.

43. Teignes : examen direct

Les teignes sont des affections du cuir chevelu causées par différents champignons et surtout rencontrées chez les enfants. Les sujets atteints perdent leurs cheveux par plaques rondes de taille variable.

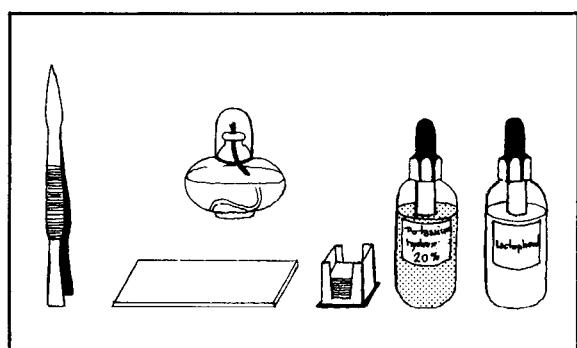
Au laboratoire on recherche directement ces champignons au microscope sur un cheveu.

On peut aussi effectuer des cultures pour les identifier dans les laboratoires spécialisés (cultures mycologiques).



MATÉRIEL

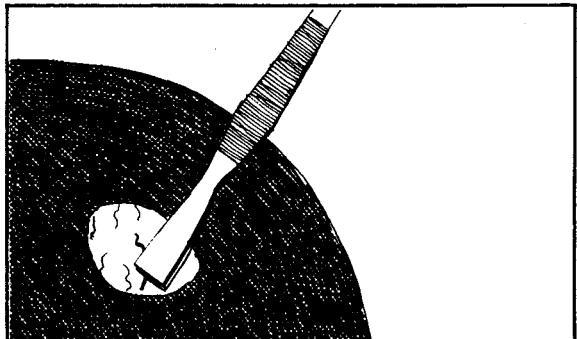
- Pince à épiler flambée
- Lame
- Lamelle
- Lactophénol au bleu de coton (réactif No. 36), si possible
- Potasse à 20% (réactif No. 45)
- Lampe à alcool.



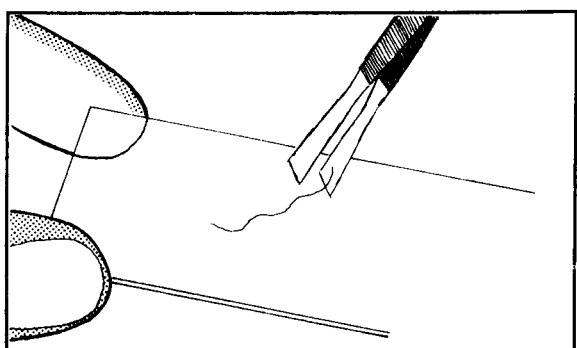
PRÉLÈVEMENT D'UN ÉCHANTILLON

Choisir un cheveu suspect, sur les bords d'une plaque chauve. Les cheveux malades sont courts, cassés, tordus et de couleur plus terne; il y a parfois une sorte de pus sec à leur base.

Placer la pince bien à la base du cheveu. Tirer d'une manière ferme mais progressive. Les cheveux parasités sont généralement lâches dans leurs follicules; ils cassent assez facilement.

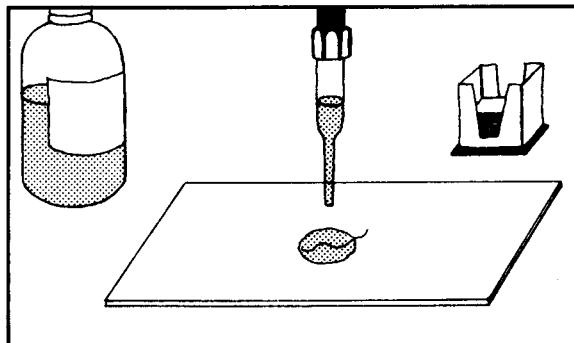


Placer le cheveu au centre d'une lame. Il est recommandé de prélever des cheveux sur plusieurs plaques (10 au total environ). On peut en mettre 3 à 4 par lame.



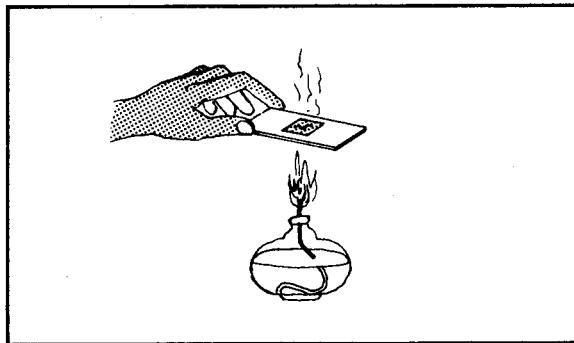
PRÉPARATION DES LAMES

1. Déposer sur les cheveux 1 goutte de bleu de lactophénol ou de potasse à 20%. Recouvrir d'une lamelle.



2. Passer la lame rapidement 4 fois dans la flamme d'un bec Bunsen pour la chauffer (ou la placer ½ minute au-dessus d'une lampe à alcool).

Attention: Le colorant, notamment la potasse, peut se mettre brusquement à bouillir et provoquer des éclaboussures. Tenir le visage à bonne distance quand on chauffe la lame.



EXAMEN MICROSCOPIQUE

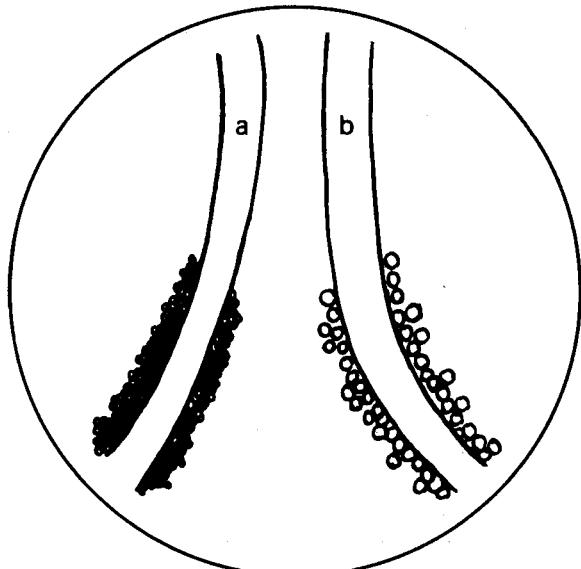
Examiner à l'objectif 40 x (fort grossissement), puis à l'objectif à immersion, si nécessaire. On cherchera les spores (gros granules de forme ronde à membrane transparente) autour du cheveu ou à l'intérieur de celui-ci.

1. Spores à l'extérieur du cheveu

Ils sont dits ectothrix. Ils forment une sorte de manchon autour de la base du cheveu. On peut trouver les éléments suivants:

(a) *Microspores ectothrix*: spores très petites (2 à 3 µm) sur plusieurs couches

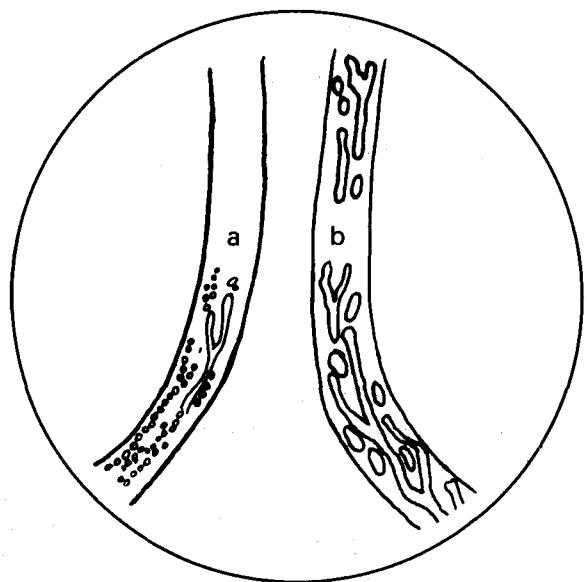
(b) *Megaspores ectothrix*: grosses spores (5 à 8 µm) sur 1 à 2 couches.



2. Spores et filaments à l'intérieur du cheveu

Ils sont dits *endothrix*. On peut trouver dans le cheveu:

- (a) *des microspores endothrix*: chaînes de grandes spores (4 à 8 µm), souvent associées à des filaments mycéliens.
- (b) *des filaments mycéliens*: clairs, épais, 4 à 5 µm de large contournés et fragmentés, ils sont entourés de bulles d'air, notamment sur les préparations à la potasse. Sur le cuir chevelu des petites croûtes jaunes se forment à la base de chaque cheveu malade.



Attention:

Ces examens sont parfois délicats, surtout au début de l'infection.

En cas de doute, prélever un cheveu de même longueur qui semble normal et le placer sur la lame à côté du cheveu malade, pour comparer. Seules les cultures permettent d'identifier l'espèce précise de champignon.

NOTATION DU RÉSULTAT

Examen microscopique direct des cheveux:

- Présence de microspores ectothrix
- Présence de filaments endothrix avec bulles d'air dans le cheveu.

Prélèvements aux ultra-violets

Dans les laboratoires spécialisés, on prélève en chambre noire. La tête du malade est éclairée aux ultra-violets. Les cheveux atteints de teignes sont souvent fluorescents et peuvent donc être facilement repérés.

IIIème PARTIE

A. EXAMEN DES URINES

1. Obtention des échantillons et aspect des urines

Les urines doivent être recueillies:

- d'une manière correcte
- dans des récipients appropriés.

Si l'échantillon n'a pas été recueilli de façon adéquate, les résultats de laboratoire risquent d'être faussés.

HEURE DE LA MITION

A l'hôpital: pour un seul échantillon d'urine, mieux vaut demander la 1ère urine du matin, celle du réveil (urine concentrée).

Au dispensaire: faire de préférence uriner le malade sur place.

Schistosomiase: pour la recherche des œufs de schistosomes, c'est l'urine émise entre 11 et 17 heures qui est la plus indiquée (voir page 178).



ÉCHANTILLONS DE 24 HEURES (parfois demandés)

Les urines sont recueillies dans un bocal propre de 2 litres, avec couvercle. Le malade urine dès qu'il se lève, mais ces urines ne sont pas conservées. En revanche, on conserve dans le bocal toutes les autres urines de la journée, ainsi que celles de la nuit suivante. Le deuxième jour, on prélève également les premières urines dans le bocal qui est alors immédiatement apporté au laboratoire. Mesurer le volume total d'urines dans une éprouvette et le noter.

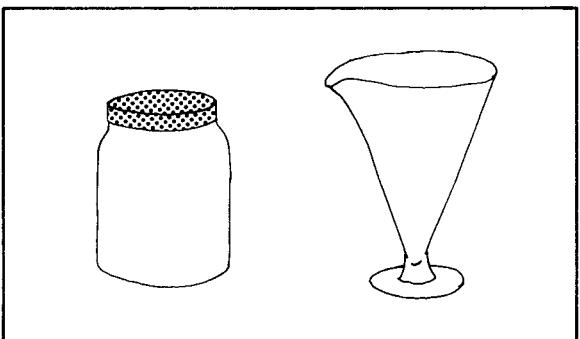
RÉCIPIENTS

Uries prélevées dans la chambre du malade:

- flacon en verre à large goulot, avec bouchon (pour les examens bactériologiques, utiliser un flacon stérile).

Uries obtenues au laboratoire:

- récipient conique pour urines
- flacon ou récipient en verre parfaitement propre.



QUANTITÉ À RECUILLIR

Prélever au minimum 50 ml dans un flacon approprié.

TOILETTE AVANT L'OBTENTION DES URINES

Femmes: Dans tous les cas, procéder à une toilette locale.
Eviter de prélever des échantillons d'urine pendant les règles.

Hommes: Une toilette locale ne s'impose que pour des recherches bactériologiques.

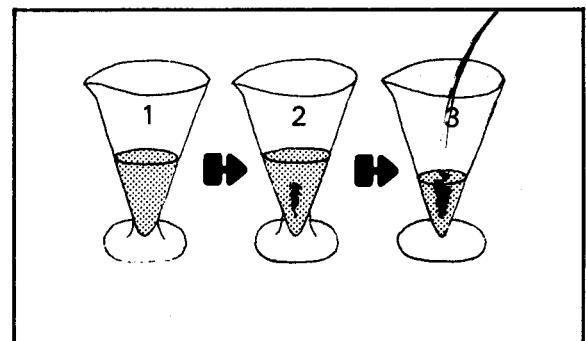
MÉTHODES D'OBTENTION DES URINES

Urines du milieu du jet:
Elles sont indispensables pour tous les examens.

Epreuve des 3 échantillons:
Elle est parfois demandée par le médecin. Le malade urine successivement, sans s'arrêter, dans 3 verres marqués 1, 2 et 3; on peut alors constater, par exemple, dans quel verre il y a le plus de sang, de pus, etc.

Prélèvements à la sonde:
Ils doivent être faits par un médecin ou un infirmier spécialisé. Ils sont pratiqués pour certaines recherches bactériologiques, surtout chez les femmes. Mais, en règle générale, un échantillon obtenu après une bonne toilette locale suffit.

Nourrissons:
On peut recueillir leurs urines dans des sacs en plastique munis d'un col adhésif. Ces sacs sont fixés autour de l'appareil génito-urinaire du bébé et laissés pendant 1 à 3 heures, selon l'examen demandé. On peut utiliser des sacs pour "anus artificiel" (colostomie).



ASPECT DES URINES

Décrire l'aspect des urines, selon qu'elles sont:
— jaunes, jaune foncé, brunes ou incolores
— claires ou troubles.

2. Densité et pH de l'urine

DENSITÉ

La mesure de la densité se fait à l'aide d'un urinomètre gradué de 1,000 à 1,060. (Rappelons qu'à 20°C la densité de l'eau est de 1,000).

Il faut aussi mesurer la température de l'urine pour en calculer correctement la densité.

Intérêt

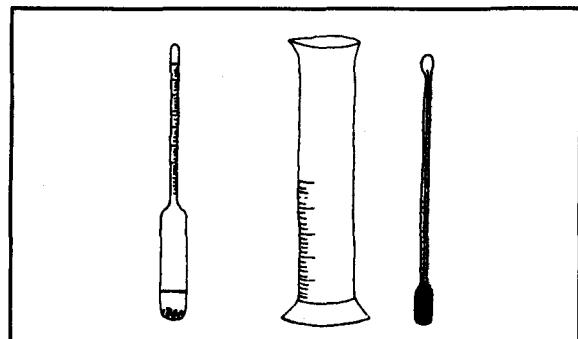
La densité de l'urine dépend du bon fonctionnement des reins:

- Urine concentrée = densité élevée
- Urine diluée = faible densité.

Matériel

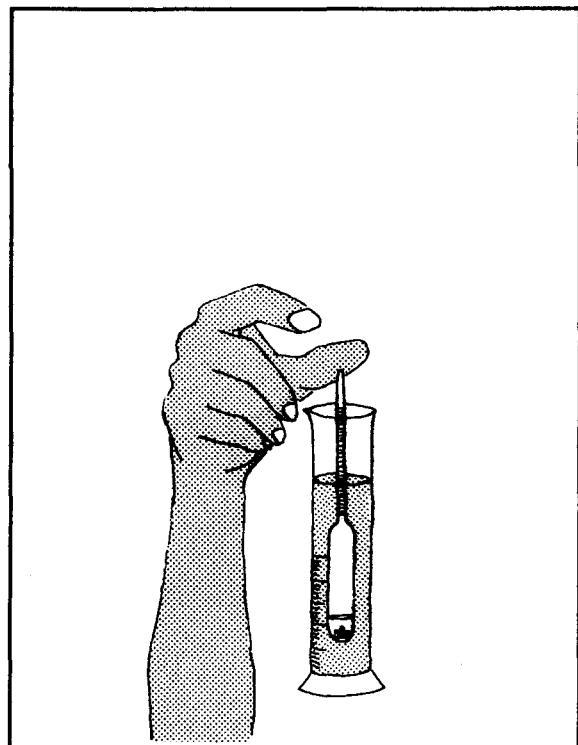
- 1 urinomètre
- 1 thermomètre (0° à 50°C)
- 1 éprouvette (50 ml).

Il faut 40 ml d'urine au moins.

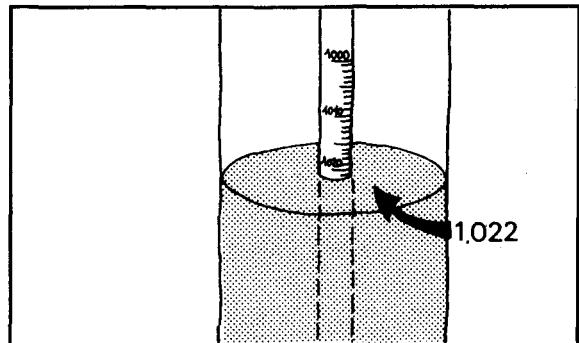


Méthode

1. Verser environ 40 ml d'urine dans l'éprouvette.
2. Y plonger l'urinomètre et le lâcher doucement.
3. Attendre qu'il se stabilise. Il ne doit pas toucher les parois ou le fond de l'éprouvette.



4. Lire la densité correspondant au niveau de la surface de l'urine (bord inférieur du ménisque).
5. Retirer l'urinomètre. Mesurer aussitôt la température de l'urine avec le thermomètre.



Calcul

Vérifier la température d'étalonnage de l'urinomètre indiquée par le fabricant. C'est le plus souvent 20°C.
On a déjà mesuré la température de l'urine.

Si la température de l'urine dépasse la température d'étalonnage de 3°C, ajouter:
— 0,001 à la densité trouvée, et ainsi de suite pour chaque tranche de 3°C.

Si elle est inférieure de 3°C à la température d'étalonnage, soustraire:
— 0,001 et ainsi de suite pour chaque tranche de 3°C.

Exemple

L'urinomètre est étalonné à 20°C.

La température de l'urine est 26°C.

La densité est de 1,021.

La température de l'urine est supérieure de 6°C à la température d'étalonnage.

Il faut donc ajouter au chiffre de densité:

$$\frac{6}{3} \times 0,001 = 2 \times 0,001 = 0,002$$

La densité réelle de l'urine est donc:

$$1,021 + 0,002 = 1,023.$$

Résultats

Densité normale: 1,020 (marge normale de variation: 1,010 à 1,025).

Faible densité: au-dessous de 1,010* (affection rénale ou endocrinienne)

Densité élevée: au-dessus de 1,025 (glycosurie, protéinurie).

*Une faible densité n'est pas significative si le sujet a bu une grande quantité de liquide avant la mesure.

Contrôle de l'urinomètre

Tous les 3 mois, contrôler l'urinomètre en le plongeant dans de l'eau distillée à la température d'étalonnage.
On doit trouver = 1,000.

MESURE DU pH

Intérêt

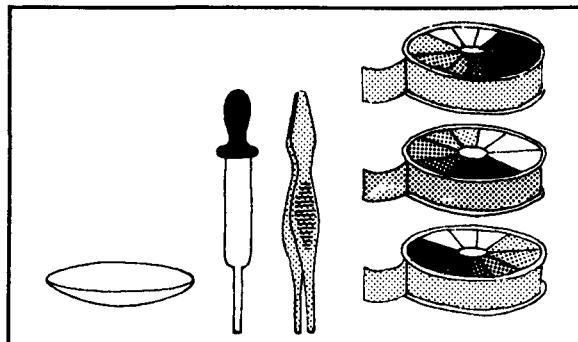
L'urine normale fraîche est légèrement acide, elle a un pH voisin de 6,0.
Dans certaines maladies, le pH de l'urine peut augmenter ou diminuer.

Principe

On utilise des papiers indicateurs colorés trempés dans l'urine.

La couleur change selon le pH.

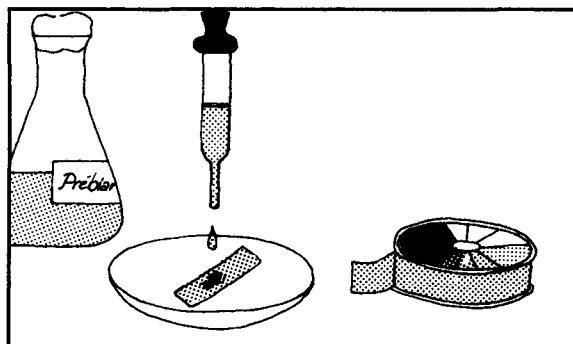
On compare alors à une échelle colorée et chiffrée.



Matériel

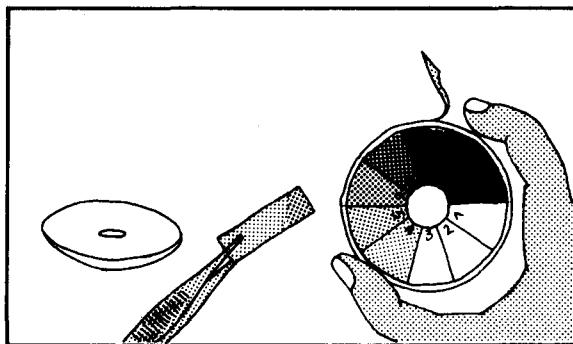
- Verres de montre
- Compte-gouttes
- Pince
- Papier indicateur universel (pour mesurer le pH de 1 à 10)
- Papier indicateur pour une zone limitée de pH soit pour la zone 5,0-7,0 et pour la zone 6,0-8,0.

L'urine doit être *fraîche*.



Méthode

1. Placer dans un verre de montre 1 bande de papier indicateur universel (pH 1 à 10).
Laisser tomber quelques gouttes d'urine fraîche sur le papier.



2. Saisir le papier avec des pinces.
En comparer la couleur avec celles de l'échelle. Noter l'unité de pH indiquée pour la couleur la plus voisine de l'échelle.

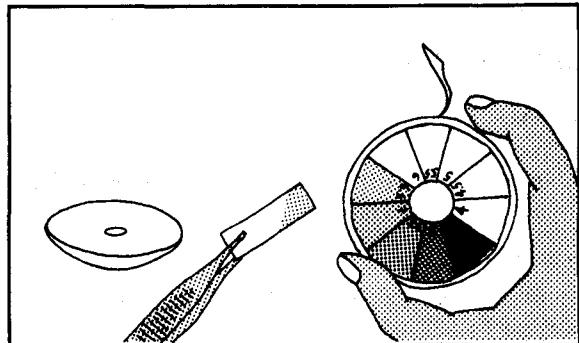
3. Selon le résultat noté, choisir une bande de papier indicateur pour la zone limitée correspondante.

Exemple:

- pH 6: papier-indicateur pour la zone 5,0-7,0
- pH 8: papier-indicateur pour la zone 6,0-8,0.

4. Recommencer la mesure dans un autre verre de montre avec la bande choisie.
Noter la valeur de pH de l'urine grâce à l'échelle colorée.
Exemple: pH = 6,2; ou pH = 7,5.

On peut aussi obtenir la mesure du pH en trempant directement le papier indicateur dans le récipient d'urine.



Résultats

pH normal environ 6,0 (marge normale de variation au cours de la journée 5,0 à 7,0).

Acidité 4,5 à 5,5 (si elle persiste: certains diabètes, fatigue musculaire, acidoses).

Alcalinité 7,8 à 8,0 (infection des voies urinaires, alimentation végétarienne).

pH et sédiments urinaires

Il est intéressant de connaître la valeur du pH de l'urine pour identifier les sédiments minéraux (voir pages 332-335).

Certains cristaux ne se trouvent que dans les urines acides, d'autres dans les urines alcalines.

Par exemple:

- Urines acides: oxalates, acide urique
- Urines alcalines: phosphates, carbonates.

Rappel: Les liquides acides ont un pH de 0 à 7 (0 correspondant au liquide le plus acide).

Les liquides alcalins ont un pH de 7 à 14 (14 correspondant au liquide le plus alcalin).

3. Glucose : recherche et dosage dans les urines

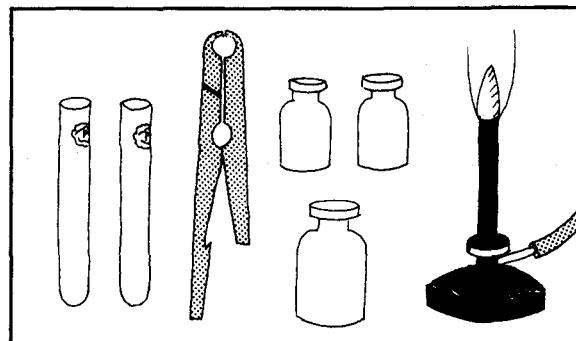
Principe

Le glucose (sucre de l'urine des diabétiques) est un réducteur: il transforme le sulfate de cuivre *bleu* de la solution de Bénédict en oxyde cuivreux *rouge*, qui est insoluble.

MÉTHODE DE BÉNÉDICT

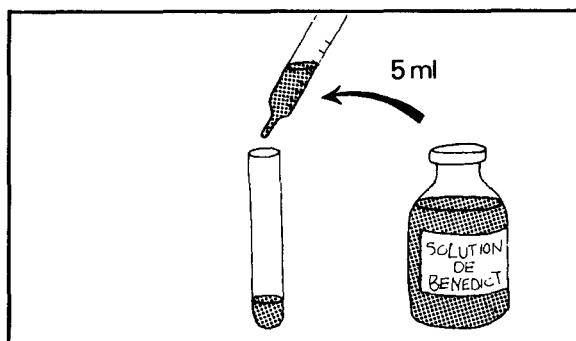
Matériel

- Tubes à essai en Pyrex
- Pinces en bois pour tubes à essai
- Bécher
- Bec Bunsen
- Flacons pénicilline
- Pipette
- Solution de Bénédict (réactif No. 9)

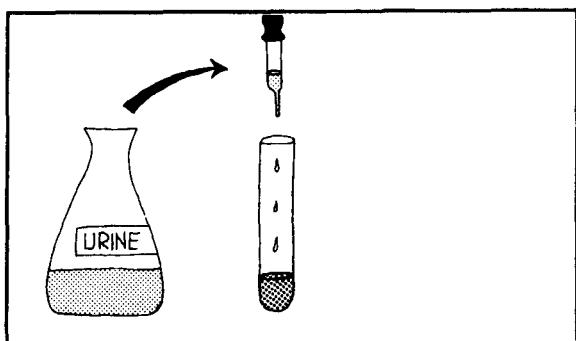


Méthode

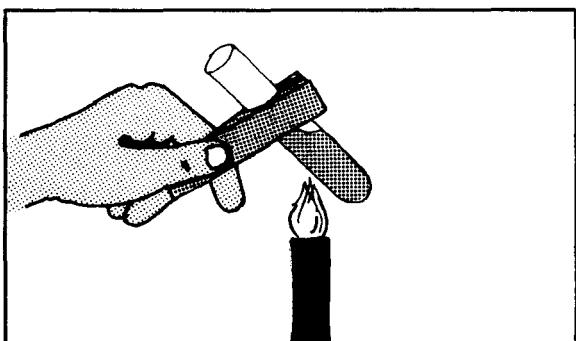
1. A l'aide d'une pipette, transvaser 5 ml de solution de Bénédict dans un tube à essai.



2. Ajouter 8 gouttes d'urine et bien mélanger.



3. Faire bouillir 2 minutes au-dessus d'un bec Bunsen ou d'une lampe à alcool, ou placer le tube pendant 5 minutes dans une boîte métallique ou un bêcher plein d'eau bouillante.
4. Laisser refroidir à température ambiante.



Lecture du résultat

Observer tout changement de couleur ou apparition de précipité.

Couleur	Résultat (présence de glucose)	Concentration approx. (mmol/litre)
Bleu	Négatif	0
Vert	Trace	14
Vert avec précipité jaune	+	28
Jaune à vert foncé	++	56
Brun	+++	83
Orange à rouge brique	++++	111 ou plus

Note: Pour la recherche du sucre dans les urines à l'aide de papiers indicateurs, voir page 323.

4. Protéines : recherche et dosage dans les urines

RECHERCHE DES PROTÉINES DANS LES URINES

MÉTHODE UTILISANT L'ACIDE SULFOSALICYLIQUE À 30%

Principe

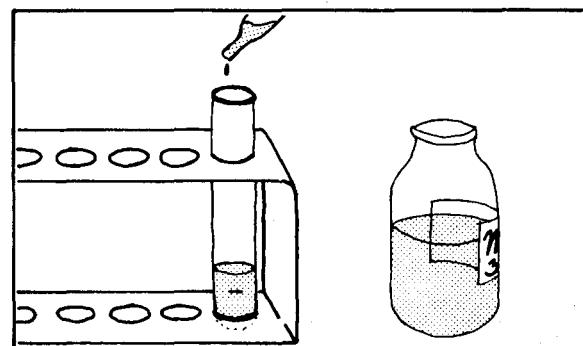
Quand on ajoute de l'acide sulfosalicylique à des urines contenant des protéines il se forme un précipité blanchâtre.

Uries

Les urines doivent être claires. Si elles sont troubles, les filtrer au papier-filtre ou utiliser le surnageant d'un échantillon centrifugé.

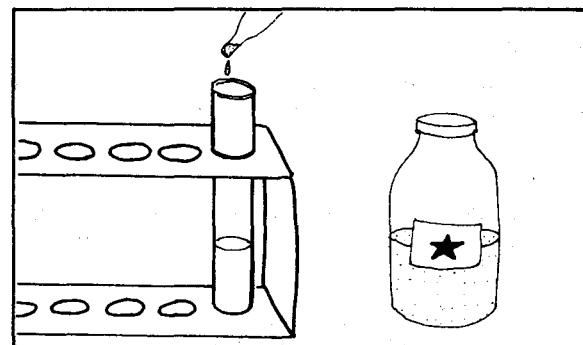
Matériel

- Tubes à essai
- Pipette graduée de 5 ml
- Acide sulfosalicylique à 30%, en solution aqueuse (réactif No. 6).

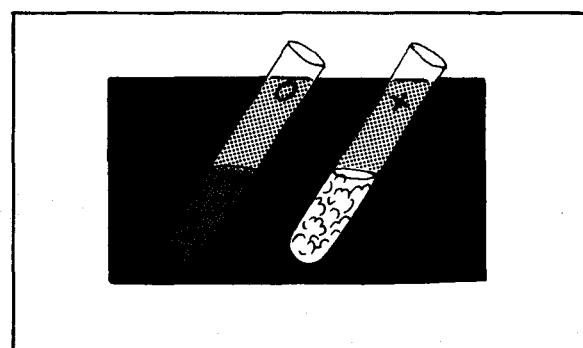


Méthode

1. A l'aide d'une pipette, verser 5 ml d'urine dans un tube à essai.



2. Avec un compte-gouttes, ajouter à l'urine 2 gouttes de solution d'acide sulfosalicylique.



3. Comparer sur un fond sombre avec un tube d'urines non traitées.

Résultats

Résultat positif

Quand on ajoute le réactif, il se forme un précipité blanc. C'est une méthode utile quand il s'agit d'étudier un grand nombre d'échantillons d'urines. Indiquer les résultats comme suit:

- | | |
|------------|---------------------------|
| + | trace |
| ++ | petite quantité |
| +++ | quantité assez importante |
| ++++ | grande quantité (opaque). |

Résultat négatif

Il ne se forme aucun précipité quand on ajoute le réactif.

Note: Pour la recherche des protéines à l'aide de papiers indicateurs, voir page 323.

DOSAGE DE LA PROTÉINURIE

Principe

C'est une épreuve quantitative qui utilise de l'acide sulfosalicylique et des tubes témoins (protéinomètre) comme méthode de comparaison visuelle pour estimer les quantités présentes d'albumine.

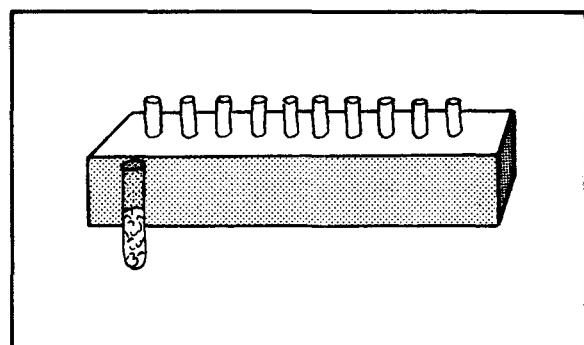
Matériel

- Solution d'acide sulfosalicylique à 3% (réactif No. 5)
 - Tubes témoins (protéinomètre).
-

Méthode

1. A l'aide d'une pipette, verser 1 ml d'urine dans un petit tube dont l'ouverture a le même diamètre que les tubes témoins.
 2. Ajouter 3 ml de solution d'acide sulfosalicylique.
Mélanger et attendre 5 minutes.
-

3. Comparer l'aspect plus ou moins trouble avec celui des tubes témoins.
-



Résultats

Indiquer la quantité d'albumine en g/l.* Si le résultat dépasse 1 g/l, diluer l'urine avec du soluté physiologique et répéter l'épreuve, compte tenu des ajustements voulus.

Exemple:

Pour une dilution d'urine de 1:4, mélanger 0,25 ml d'urine à 0,75 ml de soluté physiologique. Multiplier par 4 le résultat obtenu.

* Pour passer des mg/100 ml aux g/l, diviser par 100.
Exemple: 100 mg/100 ml \times 0,01 = 1 g/l.

5. Pigments biliaires dans les urines

Intérêt

La bile secrétée par le foie contient des substances jaune verdâtre: les pigments biliaires.

Dans certaines circonstances — maladies de foie (ictères), anémies, infections . . . — ces pigments peuvent passer dans le sang, puis dans les urines.

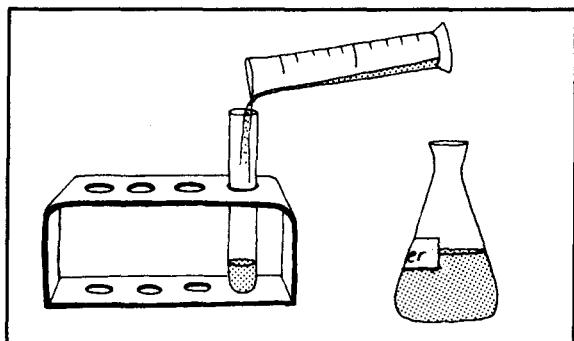
Principe

Quand on ajoute de l'iode (Lugol ou teinture d'iode) à de l'urine contenant des pigments biliaires, on obtient une coloration verte.

A. RECHERCHE AVEC LE LUGOL

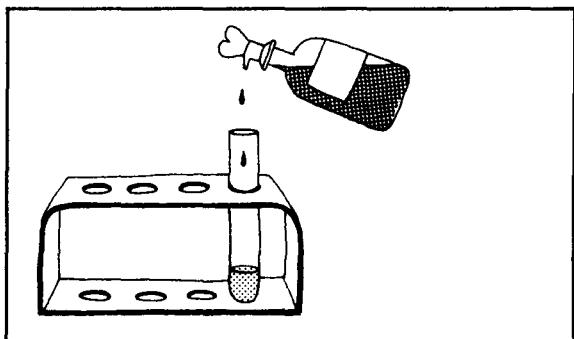
Matériel

- Tubes à essai et portoir
- Epuvette de 10 ml
- Solution de Lugol (réactif No. 38)
- Compte-gouttes.

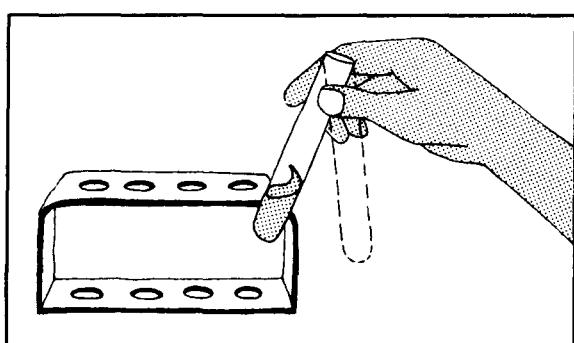


Méthode

1. Verser dans un tube à essai:
 - 4 ml d'urine.



2. Y ajouter:
 - 4 gouttes de Lugol.



3. Agiter le tube.
Observer aussitôt la coloration.

Résultats

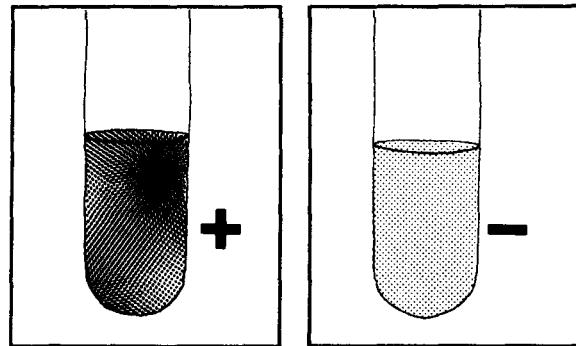
Résultat négatif

Légère coloration jaune-brunâtre.

Résultat positif

Coloration verte:

- vert pâle: +
- vert intense: ++

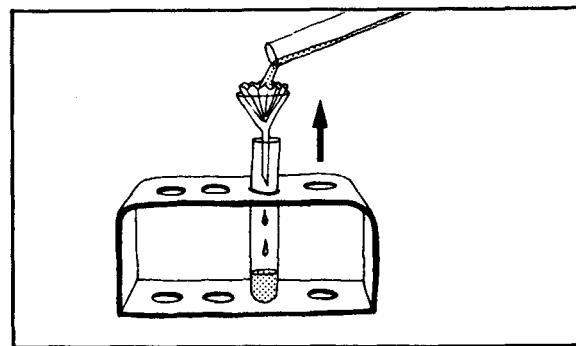
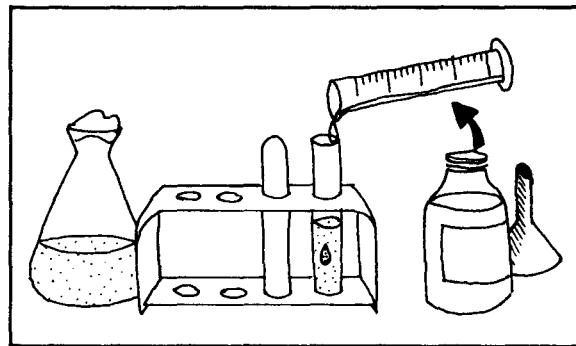
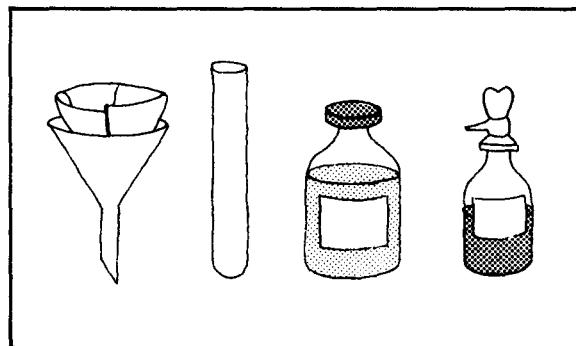


B. RECHERCHE AVEC LE RÉACTIF DE FOUCHE

C'est une technique plus sensible qui permet de confirmer les résultats obtenus avec l'iode.

Matériel

- Tubes à essai
- Entonnoir
- Papier-filtre
- Pipette ou flacon compte-gouttes
- Eprouvette de 10 ml
- Solution aqueuse de chlorure de baryum à 10% (réactif No. 15)
- Réactif de Fouchet (réactif No. 29).



Méthode

1. Mélanger dans un tube à essai:
 - 5 ml d'urines
 - 2,5 ml de solution de chlorure de baryum.

Un précipité apparaît.

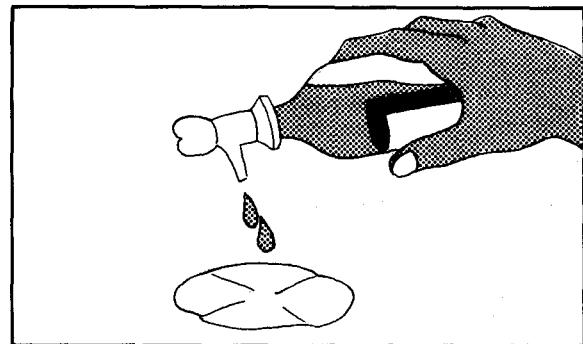
2. Filtrer le mélange.

Le précipité (qui contient les pigments biliaires) reste sur le papier-filtre.

3. Mettre le filtre à plat.

Faire tomber sur le précipité:

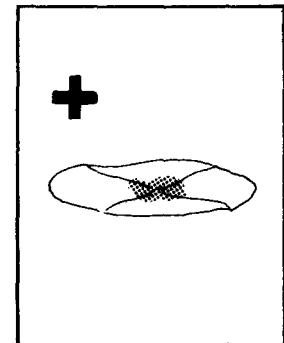
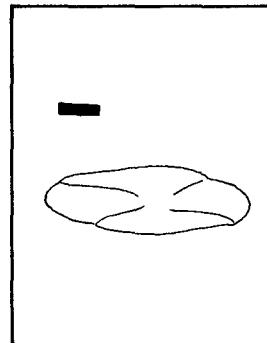
- 2 gouttes de réactif de Fouchet.



Résultats

Résultat négatif: pas de changement de couleur.

Résultat positif: le précipité vire au vert.



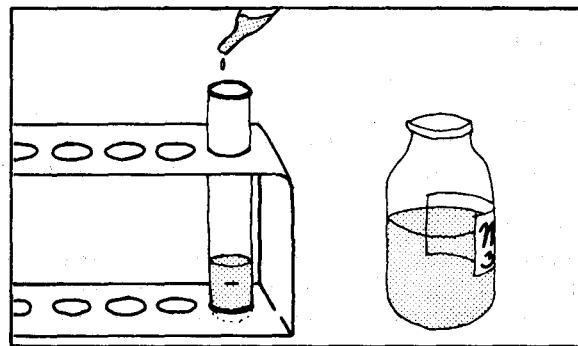
6. Présence d'urobilinogène dans les urines

MATÉRIEL

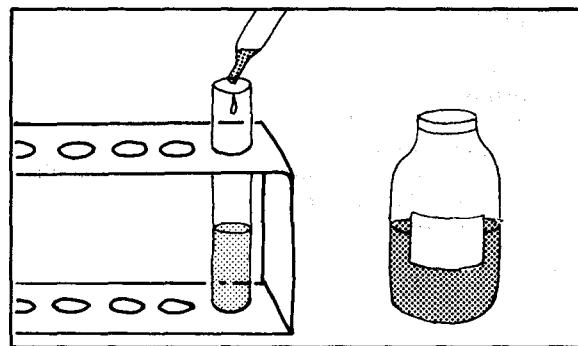
- Réactif d'Ehrlich (réactif No. 22).
- Tube à essai.

MÉTHODE

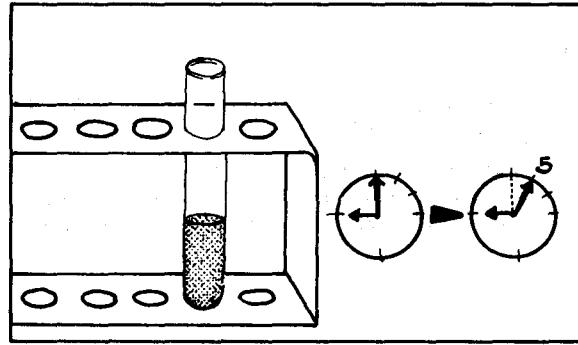
1. A l'aide d'une pipette, verser 5 ml d'un échantillon d'urine fraîche dans un tube à essai. (Si l'urine n'est pas fraîche, l'urobilinogène s'oxydera pour former de l'urobiline, qui ne peut pas être décelée par le réactif d'Ehrlich.)



2. Ajouter 0,5 ml de réactif d'Ehrlich.



3. Laisser reposer 5 minutes.



RÉSULTATS

Couleur rouge foncé — quantité excessive d'urobilinogène.

Couleur faiblement rose ou brune — présence d'urobilinogène en quantité normale.

Note: Pour l'épreuve utilisant des comprimés du commerce, voir page 324.

7. Composés cétoniques dans les urines

Intérêt

Normalement, l'urine ne contient pas de corps cétoniques.

L'acétone et d'autres composés cétoniques peuvent apparaître dans les urines:

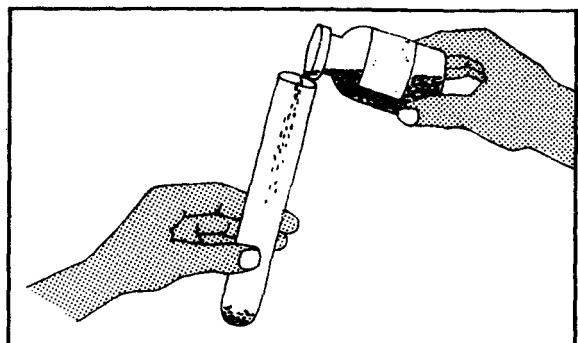
- dans certains diabètes graves ou mal contrôlés
- dans d'autres états (déshydratation, vomissements, malnutrition) ou après des exercices violents.

Principe

Lorsqu'on ajoute du ferrinitrosopentacyanure de sodium, aussi appelé nitroprussiate de sodium*, à de l'urine contenant des corps cétoniques, on obtient une coloration rouge-violette.

MATÉRIEL

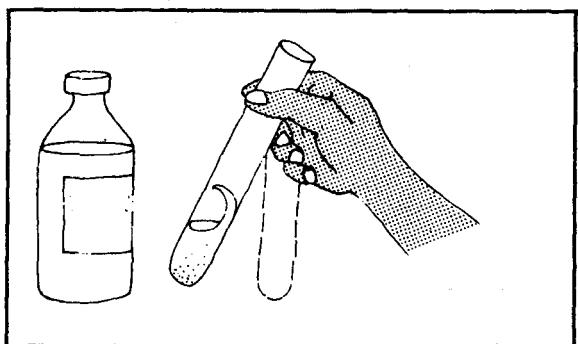
- Tubes à essai
- Portoir
- Epuvette de 10 ml
- Compte-gouttes
- Ferrinitrosopentacyanure de sodium (cristallisé)
- Acide acétique glacial (+)
- Ammoniaque.



MÉTHODE

1. Préparation de la solution de ferrinitrosopentacyanure de sodium

Juste avant l'épreuve, mettre dans un tube à essai quelques cristaux de ferrinitrosopentacyanure de sodium (de manière à remplir le fond du tube).

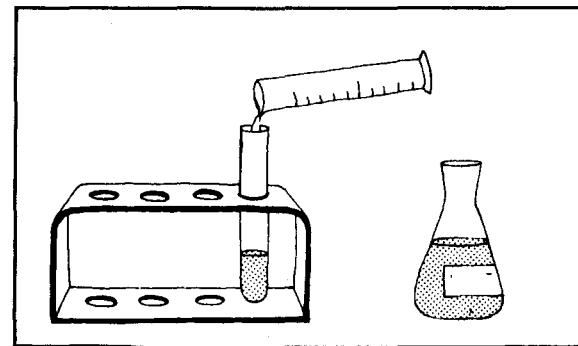


2. Ajouter 5 ml d'eau distillée.

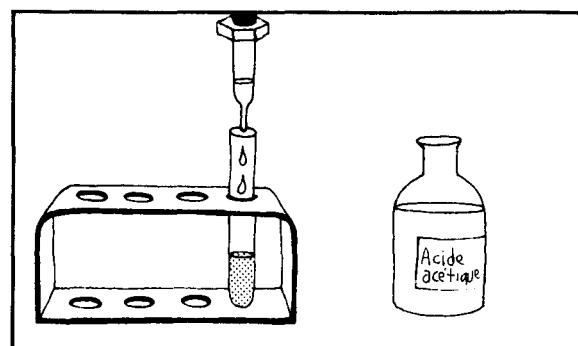
Agiter jusqu'à ce que les cristaux soient presque dissous. Ils ne le seront pas tous, car la solution est saturée.

* Le flacon du laboratoire pourra porter le nom, recommandé sur le plan international, de ferrinitrosopentacyanure de sodium, celui de nitrosoferricyanure de sodium, ou encore celui, plus ancien, de nitroprussiate de sodium. Ces trois noms désignent la même substance, l'usage variant selon le fournisseur.

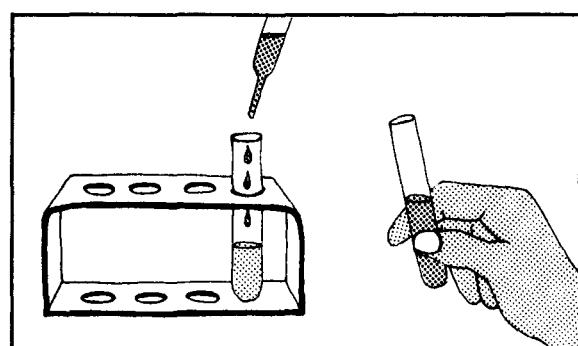
3. Dans un autre tube à essai, mesurer:
– 10 ml d'urine.



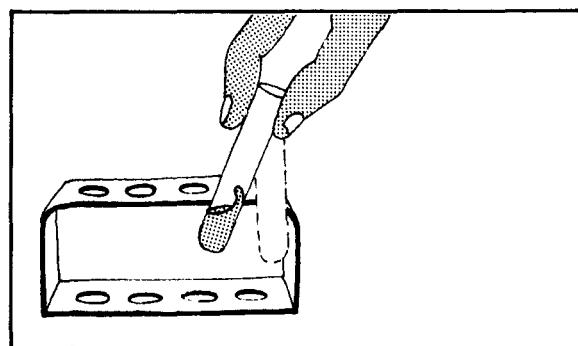
4. Ajouter à l'urine:
– 10 gouttes d'acide acétique.



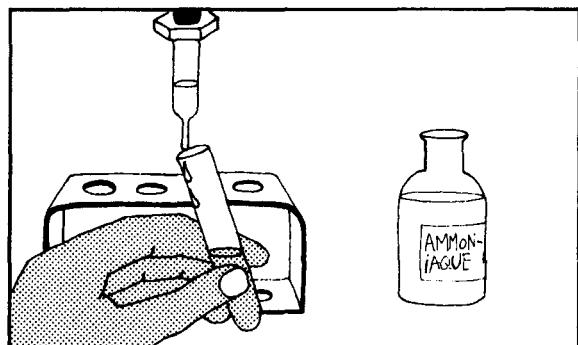
5. Ajouter ensuite:
– 10 gouttes de la solution fraîchement préparée.



6. Bien mélanger.



7. En tenant la pointe du compte-gouttes contre la paroi du tube, verser 20 gouttes d'ammoniaque (1 ml) à la surface du liquide.
Attendre 5 minutes.

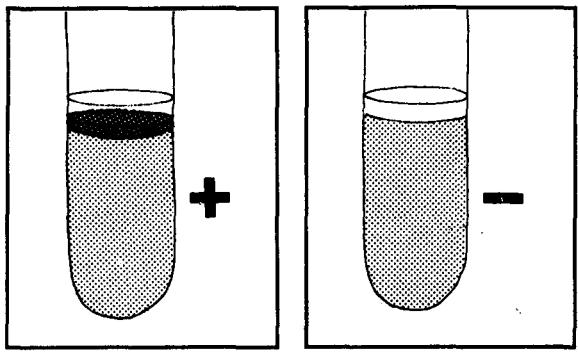


RÉSULTATS

Résultat négatif: pas de changement de couleur.

Résultat positif: anneau rouge-violet à la surface du liquide.

Anneau rosâtre: +, rouge: ++, violet foncé: +++.



Note: Recherche de l'acétonurie à l'aide de papier indicateur, ou de comprimé du commerce: voir page 324.

8. Utilisation de papiers indicateurs ou de comprimés-réactifs pour les examens d'urines

Principe

Les réactifs du commerce sont:

- soit des bandes de papier que l'on trempe dans l'urine
- soit des comprimés sur lesquels on dépose une goutte d'urine
- soit des comprimés que l'on met en contact avec l'urine.

Le papier change de couleur quand le résultat est positif.

Mode d'emploi et précautions à prendre

Conservation: Garder bien au sec. Reboucher les flacons immédiatement après usage.

Se conformer aux instructions du fabricant.

Intérêt

Avantages: Méthode rapide, facile à appliquer, n'exigeant ni balance, ni verrerie, ni produits chimiques.

Inconvénients: Réactifs souvent coûteux. Certains résultats sont difficiles à interpréter. Certains papiers ou comprimés ne sont pas stables et peuvent ne pas réagir.

A. Papiers réactifs

Se conformer aux instructions du fabricant.

B. Comprimés

Le mode d'utilisation varie selon la recherche. Voir ci-dessous.

TYPES DE PAPIERS INDICATEURS ET DE COMPRIMÉS RÉACTIFS*

1. Recherche de la glycosurie

Bandes de papier (généralement imprégnées de glucose-oxydase et de réactifs colorants).

Résultat positif: généralement, le papier vire au bleu violet.

Avantage

Les papiers réactifs à la glucose oxydase sont spécifiques du glucose. Ils peuvent servir à confirmer une réaction faiblement positive obtenue par une épreuve non spécifique.

2. Recherche de la protéinurie

Bandes de papier (imprégnées de bleu de tétrabromophénol).

Résultat positif: généralement, le papier vire au jaune-vert (traces de protéines) ou au bleu-vert (résultat nettement positif).

Inconvénient

Les papiers réactifs pour protéines sont souvent trop sensibles; ils peuvent donner des résultats faiblement positifs inexacts.

* Dans tous les cas, suivre à la lettre les instructions du fabricant.

3. Recherche des corps cétoniques

Bandes de papier (imprégnées de ferrinitrosopentacyanure de sodium).

Résultat positif: le papier vire au violet en 30 secondes.

Comprimés (technique la plus courante):

- placer le comprimé dans un verre de montre
- déposer une goutte d'urine sur le comprimé.

Résultat positif: coloration violette en 30 secondes.

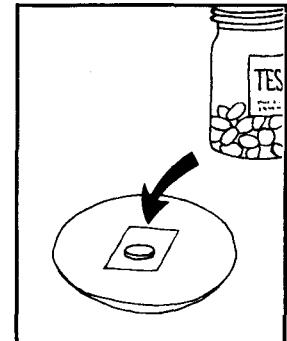
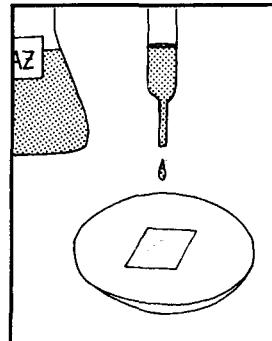
4. Recherche de l'urobilinogène

(*p*-diméthyl-amino-benzaldéhyde).

Comprimés. Les types les plus courants s'utilisent comme suit:

1. Placer un petit carré de papier-filtre dans un verre de montre.
2. Déposer 5 gouttes d'urine sur le papier.
3. Placer un comprimé au centre du carré de papier.
4. Faire tomber 2 gouttes d'eau sur le comprimé.

Résultat positif: un anneau rouge apparaît sur le papier, autour du comprimé.



5. Recherche de sang

Bandes de papier (imprégnées d'orthotoluidine).

Résultat positif: généralement, le papier vire au bleu en 1 minute.

9. Sédiments urinaires

Principe

L'urine contient en suspension des éléments microscopiques (cellules, cristaux, etc.). On les rassemble par centrifugation et on examine une goutte du culot au microscope, entre lame et lamelle.

Comme tous ces éléments formeraient un sédiment dans l'urine au bout de quelques heures, on les appelle des sédiments urinaires.

Obtention d'un échantillon d'urine

Examiner l'urine d'une seule miction.

Examiner l'urine du milieu du jet, aussi fraîche que possible

- prélevée au laboratoire
- ou apportée rapidement de la chambre du malade (2 heures au plus après l'émission).

Le récipient sera fourni par le laboratoire.

Indiquer aux femmes comment faire une toilette locale préalable (voir page 525).

Ne jamais utiliser des urines conservées au réfrigérateur.

Intérêt

Dans certaines maladies des voies urinaires, les sédiments urinaires sont très modifiés. On peut y trouver les éléments suivants:

- du pus
- un nombre anormal d'hématies
- des cristaux anormaux
- des parasites, etc.

Conservation de l'urine à l'aide de formol

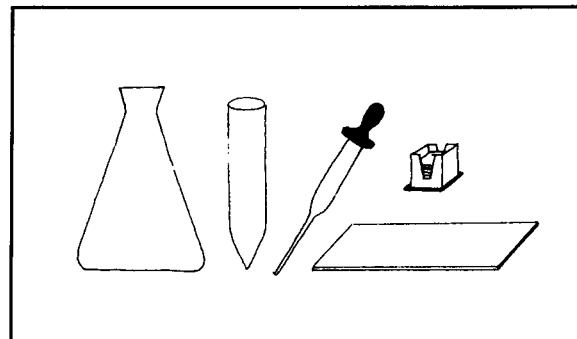
On peut conserver de l'urine pour l'examen des sédiments en y ajoutant:

- 8 gouttes de formol à 10%, pour 300 ml d'urine.

L'urine ainsi traitée ne peut pas être utilisée pour d'autres examens de laboratoire.

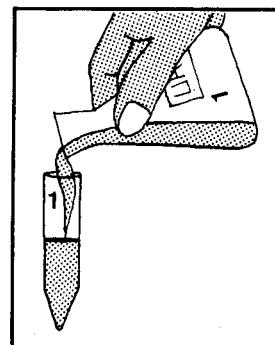
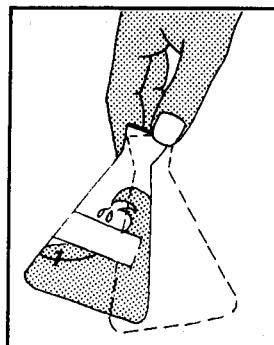
MATÉRIEL

- Centrifugeur électrique ou à main
- Tube conique à centrifuger de 15 ml
- Compte-gouttes capillaire (pipette Pasteur), si possible calibré à 50 gouttes par ml.
- Lame et lamelle 20 x 20 mm
- Eventuellement, formol à 10% (réactif No. 26).

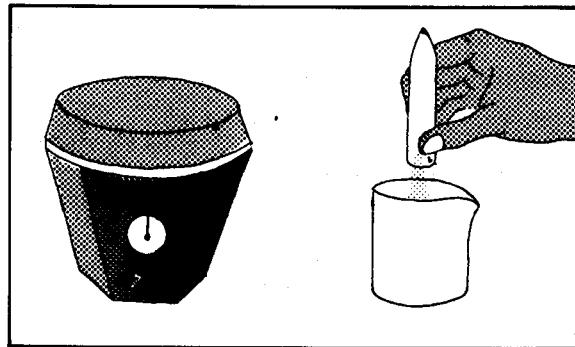


PRÉPARATION DU CULOT DE CENTRIFUGATION

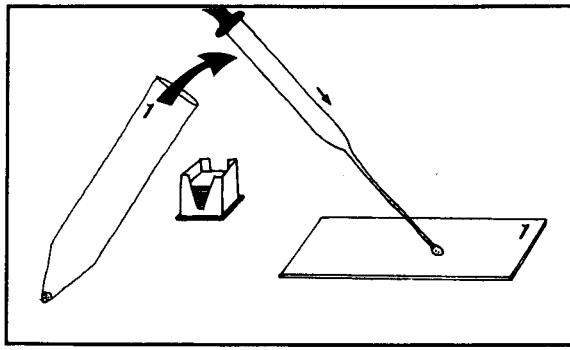
1. Mélanger délicatement l'urine.
2. Remplir aussitôt aux $\frac{3}{4}$ un tube à centrifuger.
3. Centrifuger 5 minutes à vitesse moyenne.



4. Rejeter l'urine surnageante en retournant rapidement le tube, sans à-coup.
(On peut utiliser cette urine surnageante pour des analyses chimiques).



5. Secouer le tube pour mélanger à nouveau le culot.
Aspirer quelques gouttes du culot dans une pipette.
Déposer 1 goutte sur une lame et recouvrir d'une lamelle.
Noter le numéro de l'échantillon sur la lame.



6. Examiner aussitôt au microscope:
 - d'abord à l'objectif 10 x
 - puis à l'objectif 40 x
 - sans filtre coloré
 - condenseur suffisamment baissé (ou ouverture assez réduite) pour voir les éléments transparents en réfringence.

ON PEUT TROUVER DANS LES CULOTS URINAIRES LES ÉLÉMENTS SUIVANTS:

- hématies
 - leucocytes
 - levures
 - trichomonas
 - spermatozoïdes
 - cellules épithéliales
 - cylindres
 - œufs et larves de parasites
 - cristaux.
-

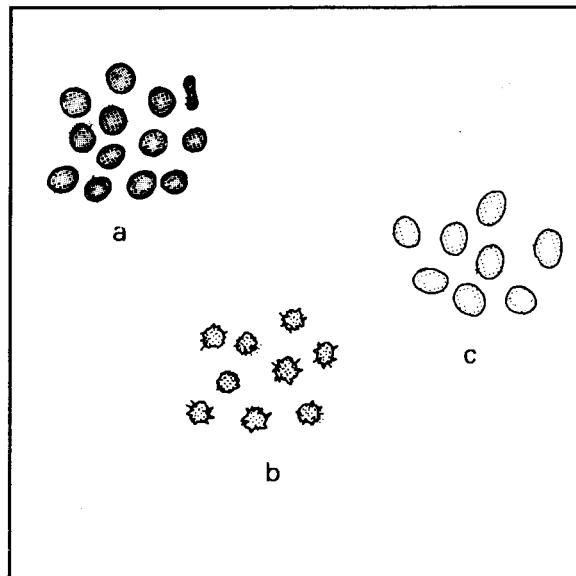
A. Hématies (globules rouges)

Elles peuvent être:

- (a) intactes: petits disques jaunâtres, aux bords plus colorés (8 µm)
- (b) en oursins: bords avec des pointes, diamètre réduit (5 à 6 µm)
- (c) gonflées: cercles fins, diamètre élargi (9 à 10 µm).

Normalement, l'urine ne doit pas contenir d'hématies.

Note: L'urine des femmes peut contenir des hématies si l'échantillon est prélevé pendant les règles.

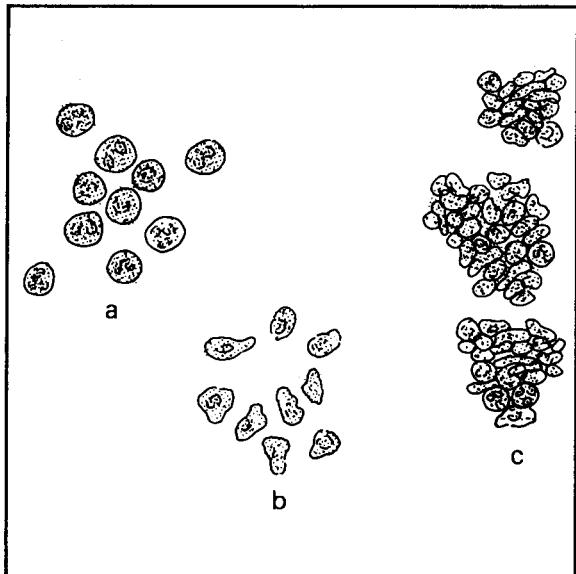


B. Leucocytes (globules blancs)

Ils peuvent être:

- (a) intacts: disques clairs, granuleux, de 10 à 15 µm, dont on peut distinguer le noyau
- (b) dégénérés: formes altérées, volume réduit, aspect moins granuleux
- (c) sous forme de pus: formé d'amas de très nombreux leucocytes altérés.

La présence de nombreux leucocytes, notamment en amas, indique généralement une infection des voies urinaires.



Comment exprimer la quantité d'hématies et de leucocytes des sédiments urinaires

Il importe d'indiquer la *quantité* des différents éléments observés.

Il importe de toujours utiliser la même méthode pour exprimer ces quantités.

Examiner au microscope:

- 1 goutte de culot (1/50 de ml), avec
- 1 lamelle de 20 x 20 mm
- à l'objectif 40 x; oculaire 5 ou 6 x

Hématies

0 à 10 hématies par champ



rares hématies
(normal)

10 à 30 hématies par champ



hématies assez nombreuses

Plus de 30 hématies par champ



nombreuses hématies

Leucocytes

0 à 10 leucocytes par champ



quelques leucocytes
(normal)

10 à 20 leucocytes par champ



leucocytes assez nombreux

20 à 30 leucocytes isolés intacts
par champ



nombreux leucocytes

Amas de plus de 20 leucocytes
altérés



nombreux amas de leucocytes

Amas et nombreux leucocytes



pus abondant

C. Levures

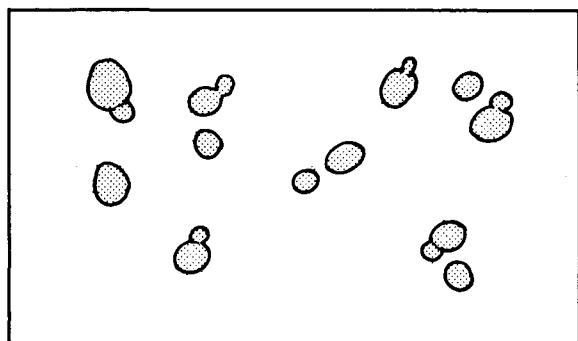
Ne pas les confondre avec des hématies.

Taille 5 à 12 µm

Forme ronde ou ovale, de dimension *variable*, en groupes. Certaines portent des bourgeons.

Elles ne sont pas solubles dans l'acide acétique.

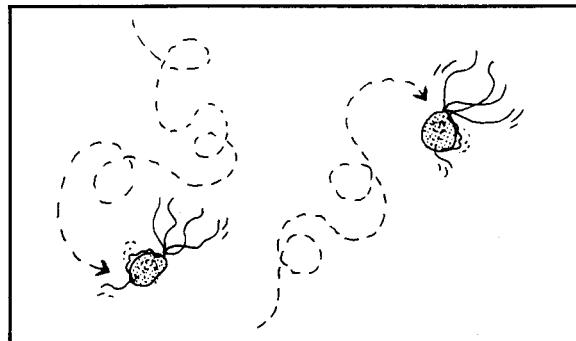
Elles accompagnent parfois la présence de glucose dans les urines. Vérifier que celles-ci sont bien fraîches.



D. Trichomonas

Taille 15 µm (2 hématies)
Forme ronde, globulaire
Mouvement mobile dans les urines fraîches (tourne, tourbillonne)
Membrane ondulante d'un seul côté
Flagelles 4 flagelles plus ou moins visibles.

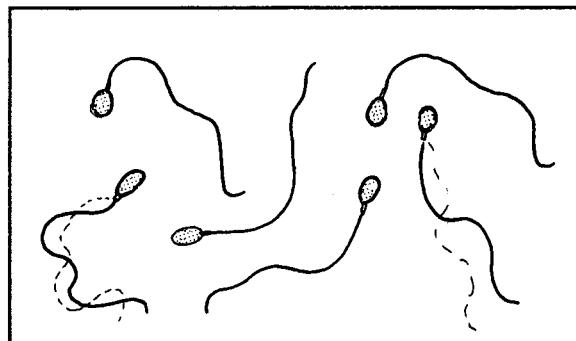
Voir aussi page 187.



E. Spermatozoïdes

Parfois trouvés dans les urines d'homme.

Tête très petite (5 µm)
Flagelle long et souple (50 µm)
Mouvement mobiles dans les urines très fraîches.

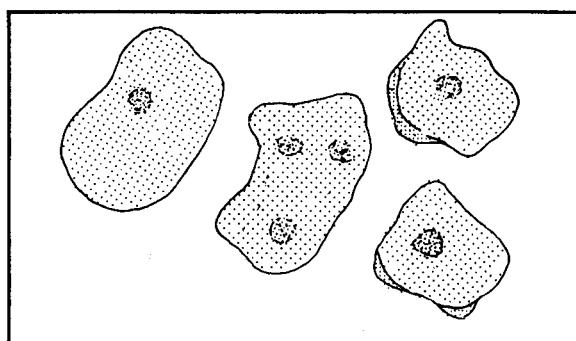


F. Cellules épithéliales

1. Cellules épithéliales pavimenteuses

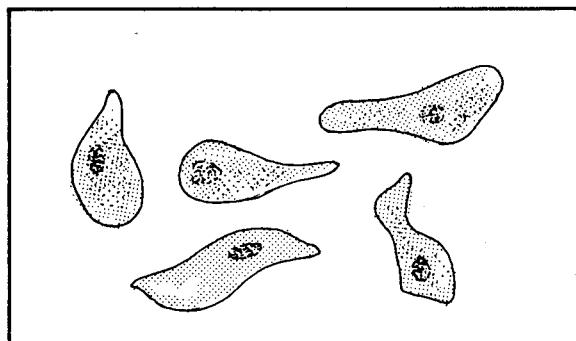
Grandes cellules rectangulaires de desquamation (arrachées aux épithéliums qui recouvrent les voies et organes urinaires).

Elles proviennent:
— de l'urètre
— ou du vagin.



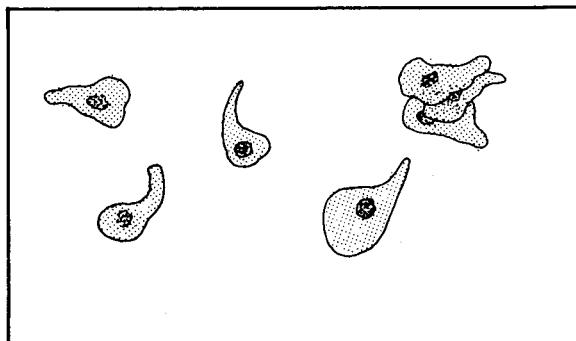
2. Cellules de la vessie

Grandes cellules souvent en losange, avec un noyau bien distinct.



3. Cellules du bassinet

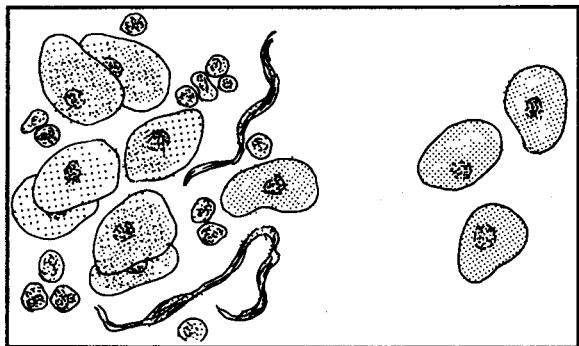
Cellules de taille moyenne (comme 3 leucocytes), granuleuses avec une sorte de queue.



4. Cellules de l'urètre ou du bassinet

Cellules moyennes, ovales, à noyau bien distinct.
Si elles sont nombreuses, accompagnées de leucocytes et de filaments, elles peuvent provenir de l'urètre.

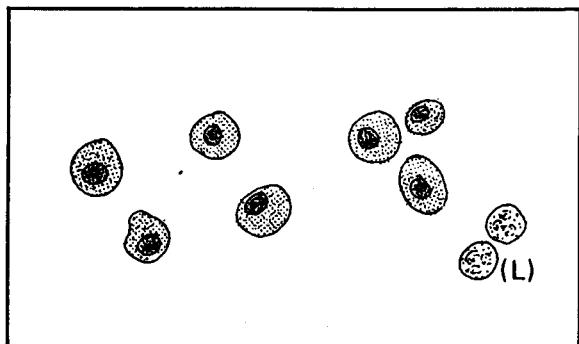
Si elles sont peu nombreuses, sans leucocytes, il peut s'agir de cellules du bassinet.



5. Cellules rénales

Les cellules rénales sont petites.
– larges comme 1 à 2 leucocytes (L)
– très granuleuses.

Le noyau y est nettement visible, réfringent. Elles sont presque toujours accompagnées de protéines dans l'urine.



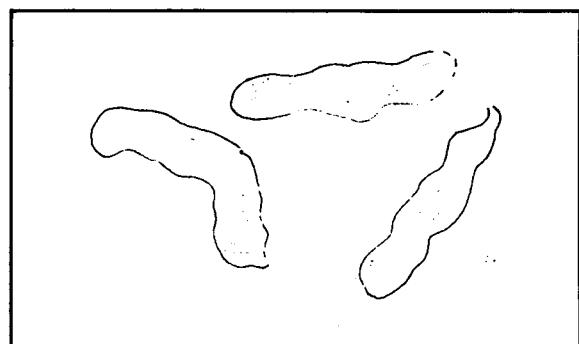
G. Cylindres

Les cylindres sont en forme de ruban cylindrique.
Ils sont longs et traversent presque tout le champ à l'objectif 40 x. Ils sont produits en cas de maladie dans les tubules du rein qui peuvent se remplir de globules, de cellules, de ou substances chimiques de dépôt.

1. Cylindres hyalins

Transparents et un peu réfringents, bouts ronds ou effilés.

(Ils peuvent être trouvés chez les sujets en bonne santé, après un violent effort musculaire.)



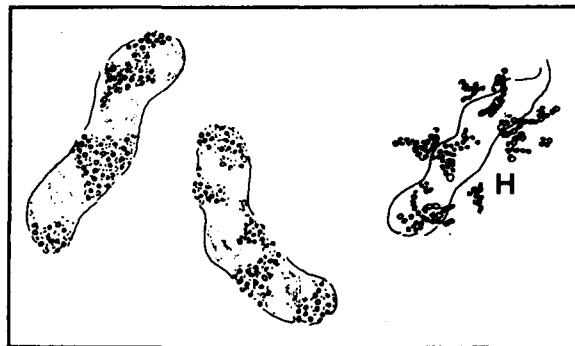
2. Cylindres granuleux

Cylindres assez courts, remplis de grosses granulations, de couleur jaune clair, aux bouts arrondis.
(Les granulations proviennent de cellules épithéliales désintégrées dans les tubules du rein.)



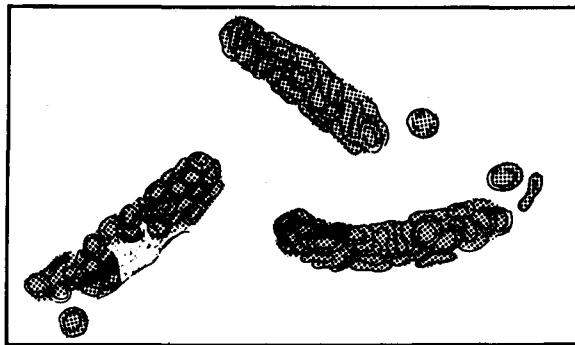
3. Cylindres semi-granuleux

Les granulations sont plus fines et ne remplissent pas tout le cylindre. Ne pas confondre avec des cylindres hyalins (H), partiellement recouverts de cristaux de phosphates amorphes.



4. Cylindres hématiques

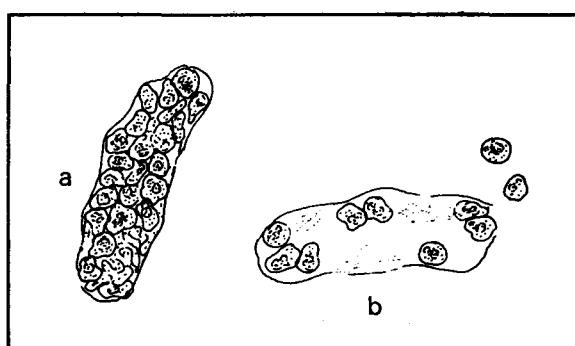
Cylindres remplis d'hématies plus ou moins altérées, de couleur brunâtre.



5. Cylindres leucocytaires

Cylindres remplis de leucocytes altérés. Lorsqu'il s'agit de pus, les cylindres sont totalement remplis de leucocytes (a).

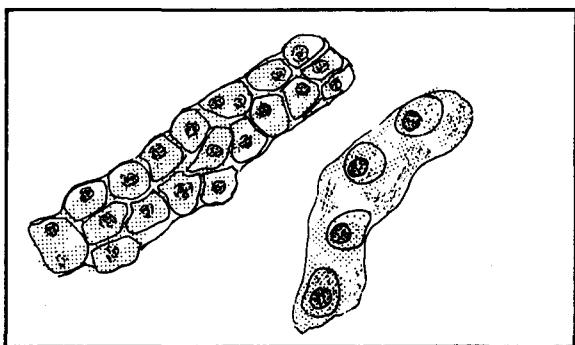
Les cylindres hyalins peuvent ne contenir que quelques leucocytes (b).



6. Cylindres épithéliaux

Cylindres remplis de cellules épithéliales de couleur jaune pâle.

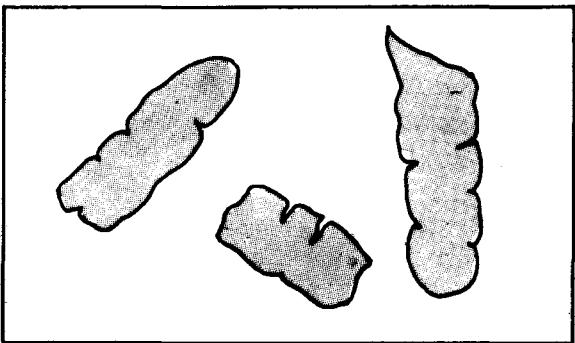
(Pour mieux voir les cellules, ajouter au culot 1 goutte d'acide acétique à 10 %.)



7. Cylindres graisseux (rares)

Cylindres très réfringents, jaunâtres, aux bords nets et dentelés, aux bouts bien arrondis. Ils sont solubles dans l'éther mais pas dans l'acide acétique.

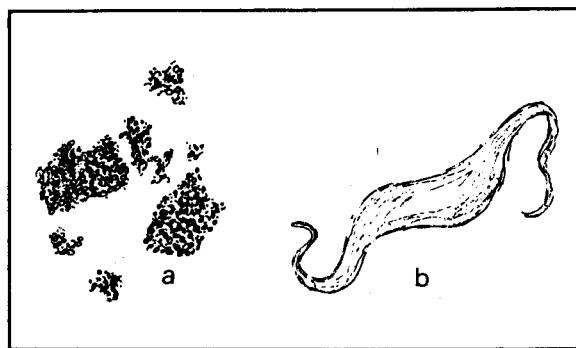
(Ils sont trouvés dans les cas d'affection grave du rein.)



8. Faux cylindres

Ne pas prendre pour des cylindres:

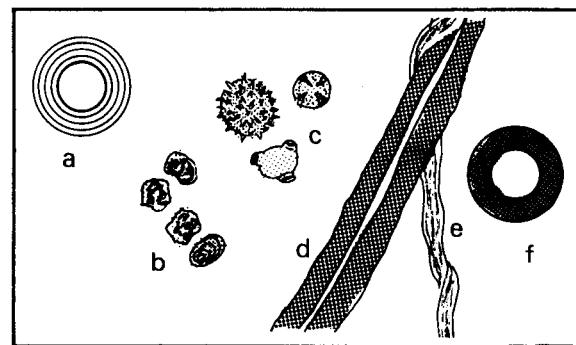
- des amas de grains de phosphates, courts et coupés nets (a)
- des amas de mucus clair, aux extrémités filamenteuses (b).



9. Corps étrangers

Si l'on utilise des récipients ou des lames souillés, ou si les urines ont été laissées à l'air libre, on peut y trouver divers corps étrangers:

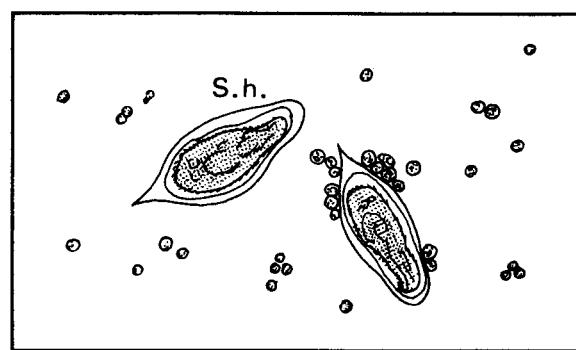
- (a) gouttes d'huile (réfringentes)
- (b) grains d'amidon (colorés en bleu-noir par le Lugol)
- (c) grains de pollen des fleurs
- (d) poils
- (e) fibres de coton
- (f) bulles d'air.



H. Oeufs et larves de parasites

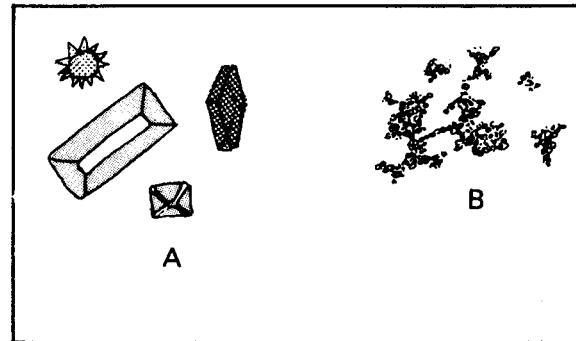
(Voir page 122)

1. *Oeufs de Schistosoma haematobium*: trouvés avec des hématies.
2. *Microfilaires de W. bancrofti*: les urines sont blanchâtres et troubles.



I. Cristaux

Les cristaux ont des formes géométriques précises (A), à la différence des sédiments amorphes, constitués par de petites granulations agglomérées, sans forme bien définie (B).



(a) SÉDIMENTS CRISTALLISÉS NORMAUX

1. Oxalate de calcium (urine acide)

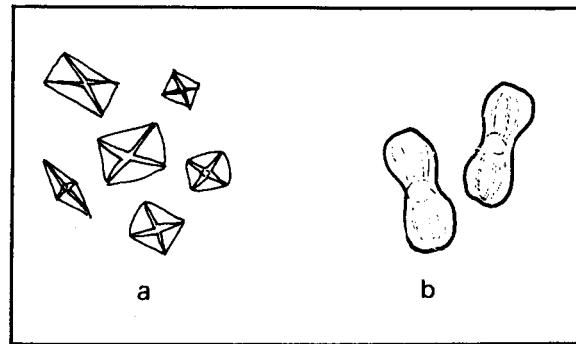
(a) Forme en enveloppe de lettre

Taille 10 à 20 µm (1 à 2 hématies)

ou

(b) Forme en arachide

Taille environ 50 µm, très réfringent.

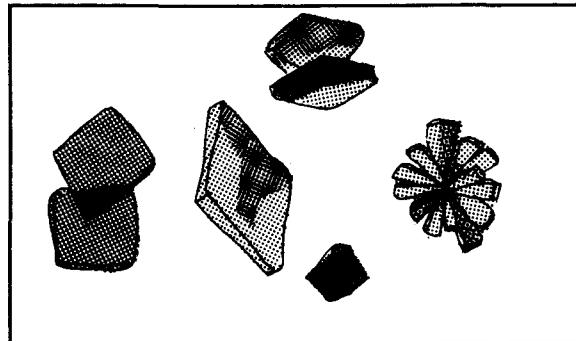


2. Acide urique (urine acide)

Forme variable (carrée, en losange, cubique ou en fleur)

Taille 30 à 150 µm

Couleur jaune ou brun-rougeâtre.

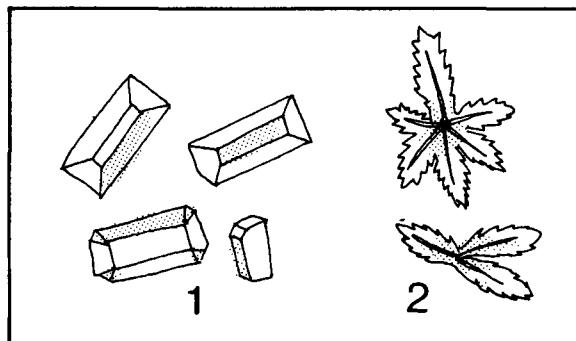


3. Phosphates triples (urine neutre ou alcaline)

Forme rectangulaire (1) ou en feuille de fougère, en étoile (2)

Taille 30 à 150 µm

Couleur incolore, réfringent.



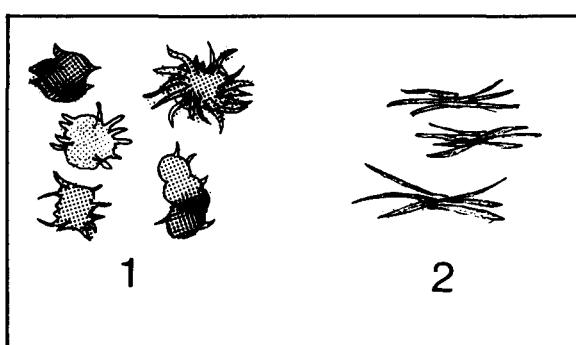
4. Urates (urine alcaline)

Forme en cactus (1) ou comme un paquet d'aiguilles (2)

Taille environ 20 µm (2 à 3 hématies)

Couleur jaune, réfringent.

(Accompagnent souvent les phosphates.)



5. Cristaux plus rares

A. Phosphate bicalcique (urine neutre ou alcaline)

Forme en étoile

Taille 30 à 40 µm

Couleur incolore

B. Carbonate de calcium (urine neutre ou alcaline)

Cristaux très petits, en forme de grain de mil, de blé, groupés par 2

Couleur incolore.

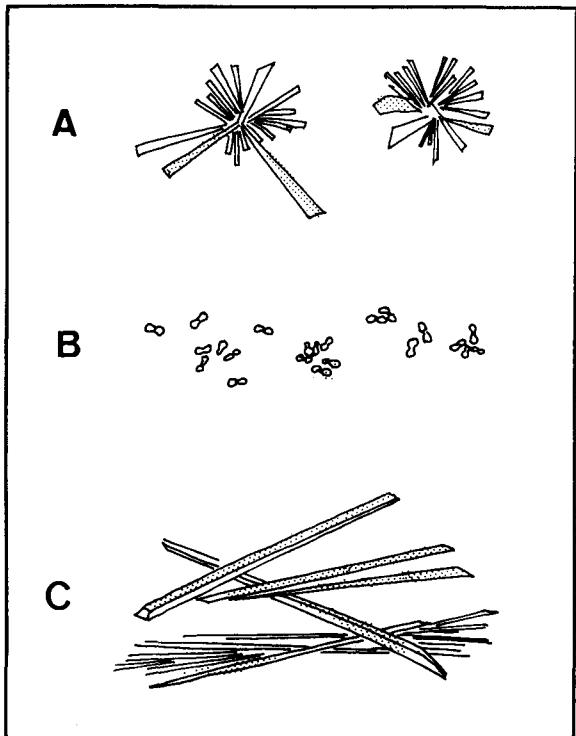
(Si on ajoute de l'acide acétique à 10%, ils se dissolvent en dégageant des bulles de gaz.)

C. Sulfate de calcium (urine acide)

Forme prismes longs ou lames plates, isolés ou en paquet

Taille 50 à 100 µm

(On peut les différencier des cristaux de phosphate bicalcique en mesurant le pH de l'urine.)



(b) SÉDIMENTS AMORPHES

1. *Phosphates amorphes (urine alcaline)*

Granulations petites, blanchâtres, souvent dispersées.

Ils sont solubles dans une solution d'acide acétique à 10% (1 goutte par goutte de culot).

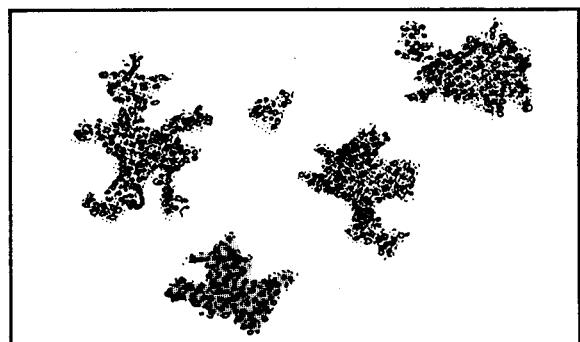


2. *Urates amorphes (urine acide)*

Granulations très fines, jaunâtres, rassemblées en paquets compacts.

Ils ne sont pas solubles dans l'acide acétique à 10%, mais ils se dissolvent si l'urine est faiblement chauffée.

(L'urine conservée au réfrigérateur présente souvent un précipité abondant d'urates.)



(c) AUTRES SÉDIMENTS CRISTALLINS

Ils sont *rarement* rencontrés dans les urines, mais lorsqu'il s'en trouve, ils sont en grande quantité.

1. *Cystine (urine acide)*

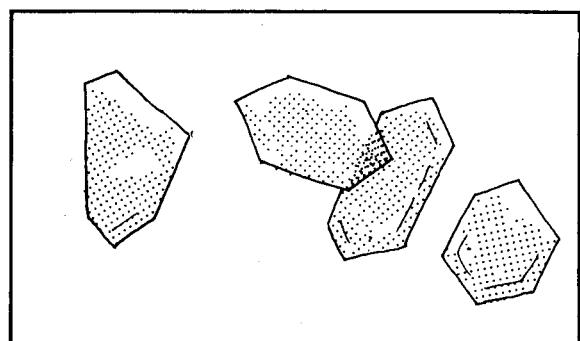
Forme plaques hexagonales

Taille 30 à 60 µm

Couleur incolore, très réfringente.

Trouvées seulement lorsque l'urine est fraîche, car elles sont solubles dans l'ammoniaque.

(Trovées en cas de cystinurie, maladie héréditaire.)



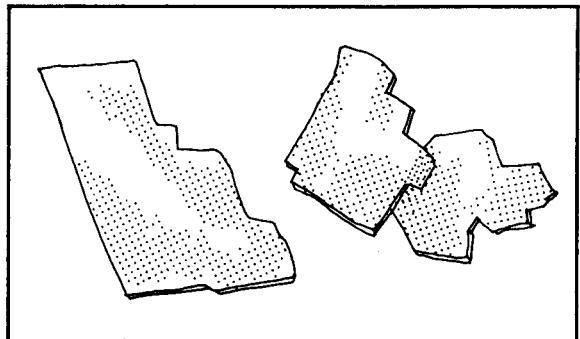
2. *Cholestérol (urine acide)*

Forme plaques plus ou moins carrées, avec un côté en escalier

Taille 50 à 100 µm

Couleur incolore, réfringent.

Solubles dans l'éther.



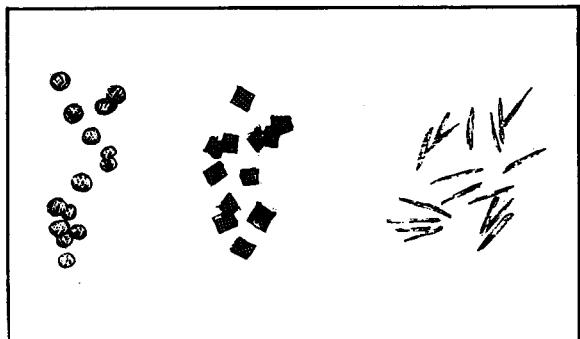
3. *Bilirubine (très rare)*

Forme très petits cristaux de forme variable, petites boules, carrés ou aiguilles

Taille 5 µm (environ ½ hématie)

Couleur brune.

(La recherche chimique des pigments biliaires est positive.)



4. *Sulfamides (urine neutre ou acide)*,

Chez les malades traités aux sulfamides.

Cristaux de forme très variable, mais le plus souvent comme des faisceaux d'aiguilles. Si l'on observe de grandes quantités de cristaux non identifiés, s'informer si le malade est traité aux sulfamides.

Leur présence doit être signalée, car ils peuvent endommager le rein.

10. Tests de grossesse

Il est possible de déterminer si une femme est enceinte ou non en testant ses urines:

- soit à l'aide de réactifs du commerce (test immuno-chimique)
- soit en injectant l'urine à des animaux de laboratoire (test biologique).

Prélèvement et conservation des urines

Pour les tests de grossesse, l'échantillon doit être *prélevé dès le réveil*. Recueillir la première urine du jour dans un flacon propre, rincé à l'eau distillée. Toute trace de détergent risquerait de fausser le résultat. Le test doit être effectué sans attendre. Si ce n'est pas possible, conserver l'échantillon au réfrigérateur.

A. TEST IMMUNO-CHIMIQUE

Il existe dans le commerce de nombreux réactifs qui permettent de faire le test:

- soit dans un tube à essai
- soit sur lame.

1. Réaction en tube

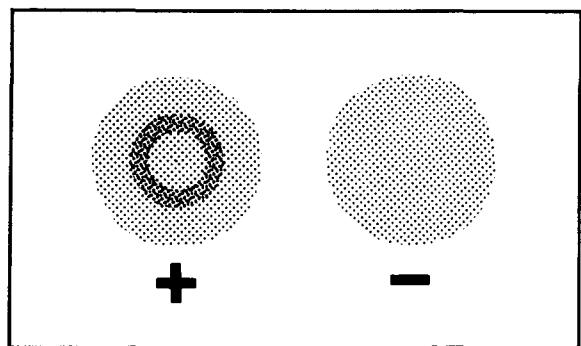
Toujours suivre à la lettre les instructions du fabricant.

Résultat positif

Pour les réactifs du commerce les plus courants, on voit apparaître dans le fond du tube un anneau brun-rouge, régulier.

Résultat négatif

Le liquide reste homogène, sans formation d'anneau.

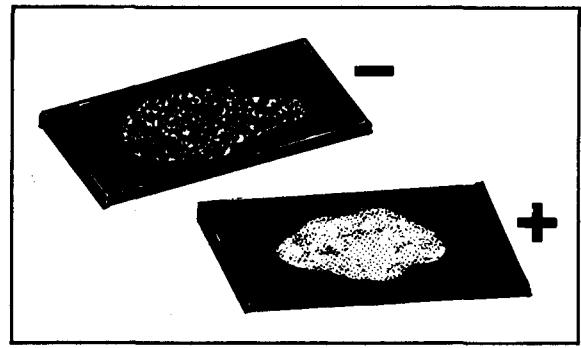


2. Réaction sur lame

Suivre les instructions du fabricant. L'un des réactifs est constitué en grande partie par une suspension de particules de latex.

Si le résultat est négatif, les particules de latex s'agglutinent sur la lame.

S'il est positif, il n'y a pas agglutination, certaines substances contenues dans les urines de la femme l'empêchant de se produire.



B. TEST BIOLOGIQUE

On a recours à différents animaux, les deux plus courants étant les crapauds ou les grenouilles mâles. On injecte l'urine à tester à l'animal. Si la femme est enceinte, celui-ci, stimulé par les hormones de l'urine, émet des spermatozoïdes dont la présence est constatée au microscope. Les techniciens de laboratoire doivent être formés avec soin par un instructeur pour pratiquer ce test en suivant une méthode précise sur un certain nombre de points: choix de l'animal, quantité d'urine à injecter, temps d'attente et examen microscopique du liquide cloacal du crapaud ou de la grenouille.

Quand le test devient-il positif?

Selon les réactifs et le type de test utilisés, on obtient un résultat positif à partir du 9ème au 15ème jour de retard des règles.

RECHERCHE DE SANG DANS LES URINES

On peut déceler la présence de sang total dans les urines fraîches en recherchant les hématies au microscope dans le culot d'un échantillon centrifugé (voir page 325).

Les réactions à la benzidine ne sont plus conseillées à cause des propriétés cancérogènes de cette substance.

Il existe des papiers réactifs permettant de déceler la présence de sang dans les urines (voir page 324).



B. EXAMEN DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

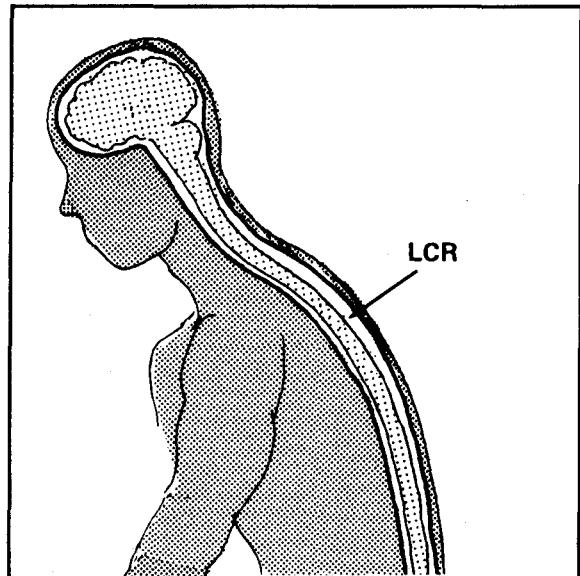
11. Prélèvement du LCR : Aspect

LCR = liquide céphalo-rachidien

Où se trouve le LCR?

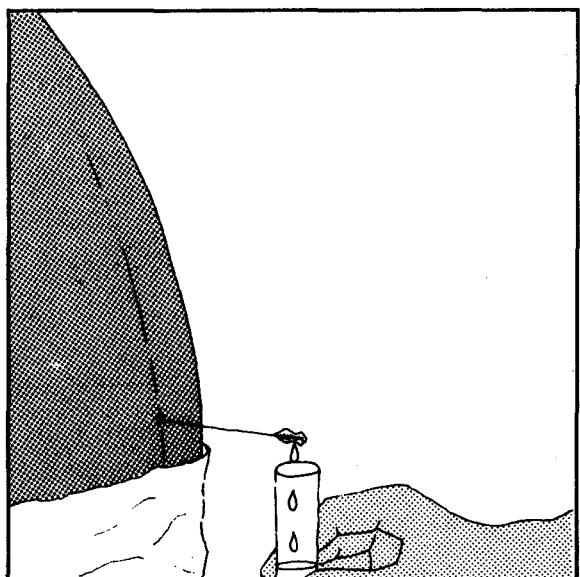
Le cerveau et la moelle épinière baignent dans le LCR à l'intérieur de la boîte crânienne et de la colonne vertébrale. Le LCR nourrit les tissus du système nerveux central et contribue à protéger des traumatismes le cerveau et la moelle épinière.

La méningite est une inflammation des méninges, membranes formant paroi dans le crâne et recouvrant le cerveau et la moelle épinière.



Volume du LCR

Pour un individu adulte, le volume total du LCR est de 100 à 150 ml.

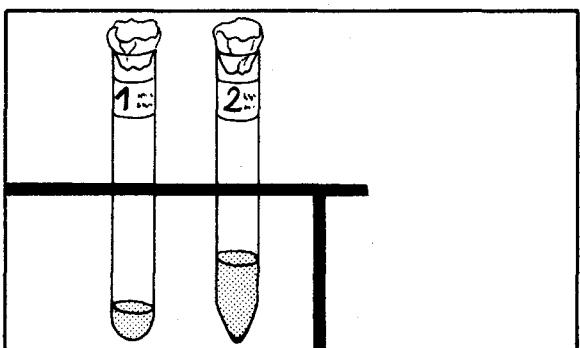


PRÉLÈVEMENT DANS 2 TUBES

Ce prélèvement ne peut être fait que par:

- un médecin
- ou un infirmier spécialisé.

1. L'aiguille de ponction lombaire est enfoncee entre la 4ème et la 5ème vertèbre lombaire, sur une profondeur de 4 à 5 cm. On retire le mandrin et le LCR coule de l'aiguille.



2. On recueille le LCR dans 2 tubes, numérotés 1 et 2:
– tube No. 1: quelques gouttes dans un tube stérile
– tube No. 2: 6 à 7 ml.

Eliminer le tube No. 1 s'il contient de nombreuses hématies.

Le tube No. 2 est utilisé pour les usages suivants:

- description de l'aspect du LCR
- concentration leucocytaire
- dosage de la glycorachie
- dosage de l'albuminorachie
- réaction de Pandy (globulines)
- examen microscopique:
 - (a) recherche des trypanosomes à l'état frais
 - (b) coloration de Gram pour recherche d'autres organismes
 - (c) coloration de Ziehl-Neelsen pour recherche de bacilles acido-résistants.

ASPECT DU LCR

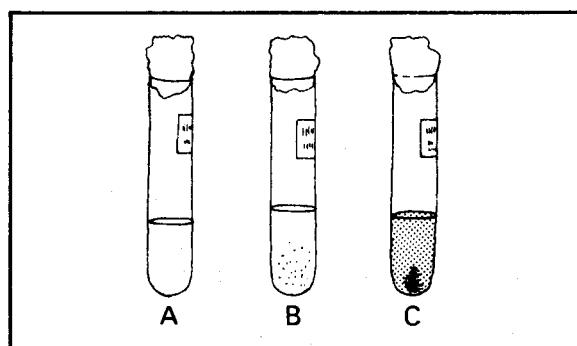
Il doit être mentionné dans le rapport du laboratoire.

A. *LCR clair*: normalement, le LCR est clair et incolore.

B. *LCR trouble*: il peut être légèrement trouble ou blanc-grisâtre, ce qui révèle la présence de pus.

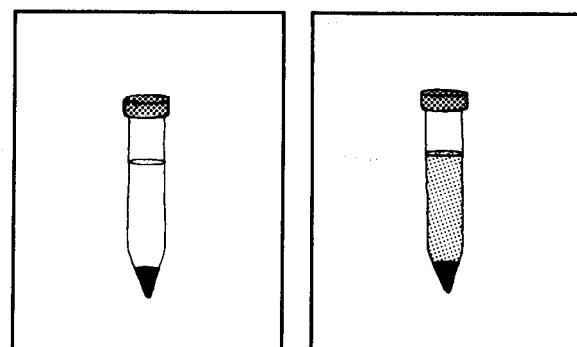
C. *LCR contenant du sang*: le LCR est trouble et rose ou rougeâtre

- soit parce qu'un vaisseau sanguin a été atteint au moment de la ponction (dans ce cas le tube No. 1 est plus coloré que le tube No. 2)
- soit à cause d'une hémorragie subarachnoïdienne (dans ce cas, les 2 tubes ont la même coloration).



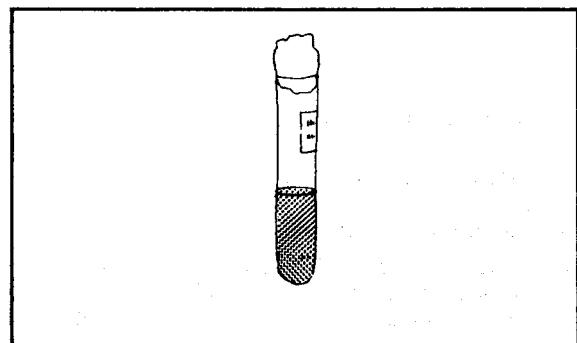
Si on ne dispose que d'un seul tube de LCR, laisser sédimentier les hématies (ou centrifuger) et examiner le surnageant.

1. S'il est limpide, la présence du sang s'explique par une atteinte accidentelle à un vaisseau.
2. S'il est coloré, il s'agit d'une hémorragie subarachnoïdienne.



D. *Xanthochromie*: le LCR est coloré en jaune, ce qui peut provenir:

- d'une hémorragie ancienne
- d'un ictere grave
- d'une compression rachidienne.



E. *Formation de caillots* (Mentionner la présence de caillots sur la fiche de résultats).

Examiner les tubes de LCR 10 minutes après prélèvement pour voir s'il n'y a pas formation de caillots:

1. LCR normal: pas de caillot.
2. On peut observer des caillots dans certaines maladies:
 - méningite tuberculeuse: un seul caillot ou un grand nombre de petits caillots fins, passant facilement inaperçus
 - méningite purulente: un gros caillot
 - compression rachidienne: prise en masse de tout le LCR.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE DANS L'EXAMEN DU LCR AU LABORATOIRE

1. Examiner le LCR sans attendre

Une fois le LCR prélevé, les éléments cellulaires et les trypanosomes se lysent rapidement. Le glucose est, lui aussi, rapidement détruit, sauf s'il est préservé à l'oxalate fluoruré (voir page 344).

2. Travailler avec soin et économie

Le laboratoire ne dispose souvent que d'un petit volume de LCR. C'est un liquide difficile à prélever, qu'il ne faut donc pas gaspiller.

3. Le LCR peut renfermer des germes virulents

Utiliser par conséquent des pipettes bouchées au coton cardé pour le prélever dans les tubes, ou employer une poire en caoutchouc pour aspirer le liquide dans une pipette.

12. Concentration leucocytaire (numération) dans le LCR

Principe

Dans certaines infections, le LCR peut contenir des leucocytes en plus ou moins grande quantité.

On examine le LCR pour déterminer:

1. *le nombre total de leucocytes* — concentration leucocytaire (numération) (à l'aide d'une cellule — hématimètre)
2. *le type de leucocytes* — identification (après coloration à l'aide d'un colorant de Romanowsky).

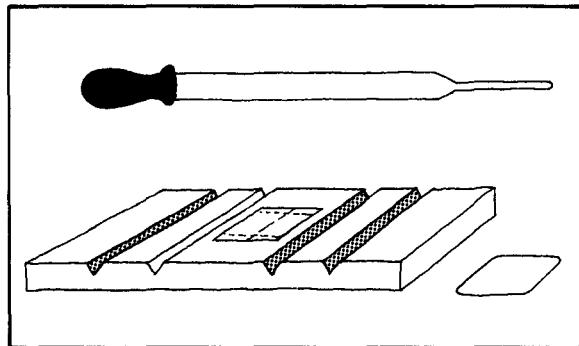
Attention:

L'étude cytologique du LCR doit être faite le plus vite possible après le prélèvement, car les leucocytes se lysent assez rapidement.

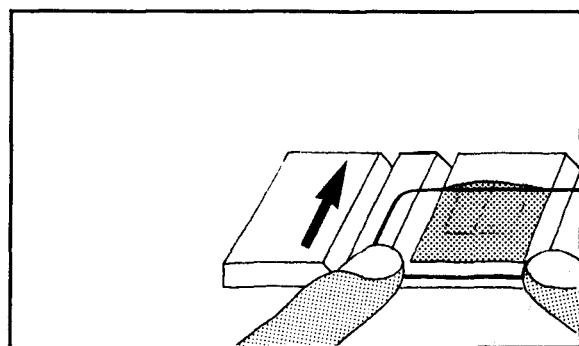
CONCENTRATION LEUCOCYTAIRE TOTALE DANS LE LCR

Matériel

- Cellule de Nageotte (ou de Fuchs-Rosenthal, dans les pays anglophones) (à défaut, on peut utiliser une cellule améliorée de Neubauer)
- Pipette Pasteur avec tétine
- Solution de Türk (réactif No. 53).



Note: La page suivante décrit l'utilisation de la cellule de Fuchs-Rosenthal. La cellule de Nageotte est formée de 40 bandes verticales, chaque bande contenant $1,25 \text{ mm}^3$. Si on l'utilise, il faut compter les leucocytes dans 8 bandes (soit 10 mm^3), multiplier le chiffre trouvé par le taux de dilution du LCR et ensuite diviser par 10 pour obtenir le nombre de leucocytes par mm^3 .



Méthode

1. Recouvrir la cellule avec la lamelle.

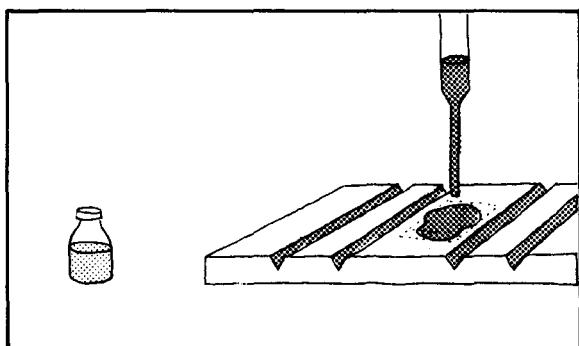
2. Mélanger doucement le LCR.

Remplir la cellule de liquide:

- pur, si le LCR est clair
- dilué, s'il est trouble.

Faire une dilution de 1:20 en utilisant 0,05 ml de LCR et 0,95 ml de solution de Türk. La transvaser avec une pipette Pasteur dans un petit flacon et mélanger.

3. Attendre 5 minutes pour permettre aux leucocytes de se déposer. Placer la cellule sur la platine du microscope.



4. Compter les leucocytes dans 1 millimètre cube de LCR, en utilisant l'objectif 10 x. Pour noter les résultats en unités SI indiquer "nombre $\times 10^6 / 1$ "; la valeur ne change pas. Exemple: 150 leucocytes par mm^3 se traduisent par "150 $\times 10^6 / 1$ ".

Attention:

Si l'on utilise du LCR pur, examiner à l'objectif 40 x, pour s'assurer qu'il s'agit bien de leucocytes.



Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical



CORRIGENDUM

Page 343, paragraphe 7, corriger le coefficient multiplicateur :

Au lieu de : Avec du LCR dilué, multiplier les leucocytes comptés par 20 et diviser par 9 pour obtenir le nombre par mm³ de LCR.

Lire : Avec du LCR dilué, multiplier les leucocytes comptés par 200 et diviser par 9 pour obtenir le nombre par mm³ de LCR.

La cellule à bandes verticales de Fuchs-Rosenthal couvre 9 mm^2 (cellule modifiée) ou 16 mm^2 , pour une profondeur de $0,2 \text{ mm}$.

Compter les leucocytes dans 5 mm^2 , en utilisant les carrés 1, 4, 7, 13 et 16.

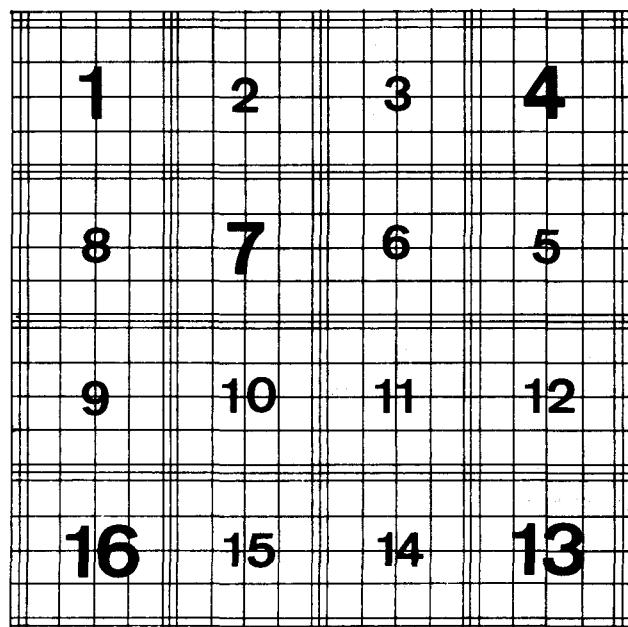
Si l'on utilise du LCR pur, aucun calcul n'est nécessaire; le nombre de leucocytes comptés correspond au nombre par mm^3 de LCR.

Si l'on utilise du LCR dilué, le nombre de leucocytes comptés multiplié par 20 donne le nombre par mm^3 de LCR.

Avec une cellule modifiée de Neubauer, compter les leucocytes sur toute la surface de la grille, soit 9 mm^2 .

Si l'on utilise du LCR pur, multiplier le nombre de leucocytes comptés par 10 et diviser par 9 pour obtenir le nombre par mm^3 de LCR.

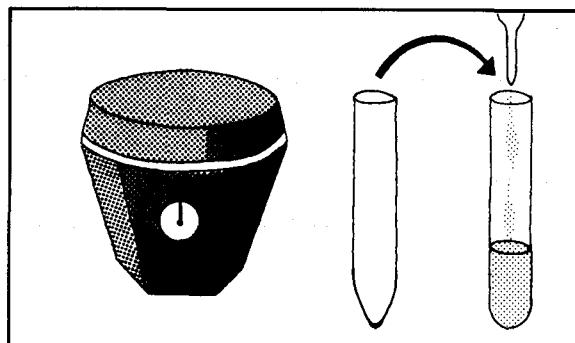
Avec du LCR dilué, multiplier les leucocytes comptés par 20 et diviser par 9 pour obtenir le nombre par mm^3 de LCR.



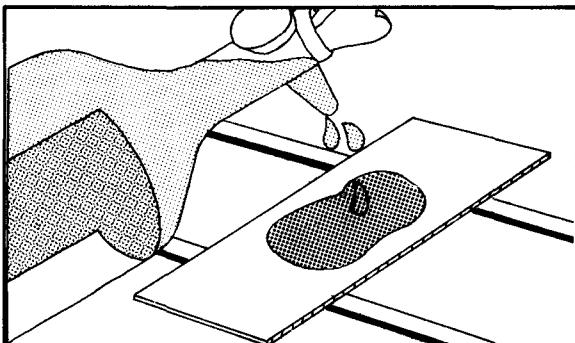
FRACTION DE NOMBRE LEUCOCYTAIRE ("FORMULE LEUCOCYTAIRE")

Si le LCR ne contient pas beaucoup de leucocytes (moins de $200 \times 10^6 / \text{l}$):

1. Centrifuger le LCR à grande vitesse pendant 10 minutes. Transvaser le surnageant dans un autre tube (il pourra être utilisé pour d'autres épreuves).



2. Mélanger le culot en tapotant le fond du tube. L'étaler sur une lame et le laisser sécher. Fixer au méthanol et colorer avec un colorant de Romanowsky, comme il est dit à la page 393. Examiner les leucocytes.



Si le LCR contient de nombreux leucocytes:

- à l'aide d'une pipette, déposer sur une lame 1 goutte de LCR non centrifugé et mélangé
- faire un étalement mince et laisser sécher
- fixer et colorer comme il est dit page 393.

Résultats

LCR normal: moins de 5×10^6 par litre (moins de 5 par mm^3)

On trouve un nombre accru de leucocytes dans les maladies suivantes:

Méningite bactérienne
(à méningocoque, à *H. influenzae*, à pneumocoque)

Méningite tuberculeuse et méningite virale

Trypanosomiase africaine

– surtout des neutrophiles

– surtout des lymphocytes

– surtout des lymphocytes, mais on peut aussi voir des cellules de Mott (voir page 347) ainsi que des trypanosomes.

13. Dosage du glucose dans le LCR (glycorachie)

Principe

En cas de méningite (purulente notamment) la teneur du LCR en glucose est fortement réduite.

MATÉRIEL

Se reporter au dosage du glucose dans le sang (voir page 429).

MÉTHODE

Suivre la méthode mentionnée pour le dosage de la glycémie, mais utiliser quatre fois plus de LCR que de sang.
Chez l'individu en bonne santé, la teneur du LCR en glucose est de 2,5 à 4,2 mmol/l*.

Attention:

Comme le glucose contenu dans le LCR est rapidement détruit après prélèvement, il importe d'effectuer cette estimation sans délai.
Si l'on prévoit que ce ne sera pas possible, le LCR doit être conservé dans de l'oxalate fluoruré (réactif No. 43).

*Soit en unités traditionnelles 45 à 75 mg/100 ml.

14. Dosage des protéines dans le LCR (albuminorachie)

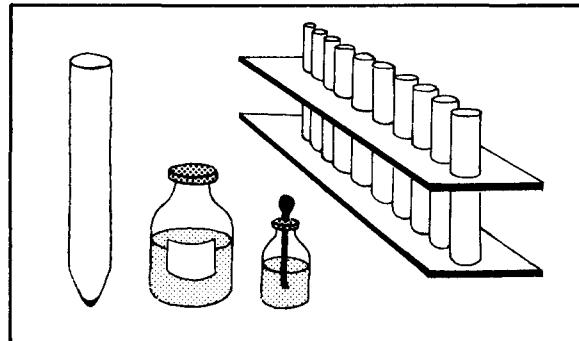
Principe

On mesure la teneur en protéines totales du LCR en le diluant dans de l'acide sulfosalicylique à 3% et en comparant l'aspect plus ou moins trouble du liquide à une série de tubes étalonnés dont le contenu est plus ou moins riche en protéines.

En ajoutant à un échantillon de LCR une solution phéniquée, la réaction de Pandy permet de mettre en évidence un accroissement de la quantité de globulines présentes dans le LCR.

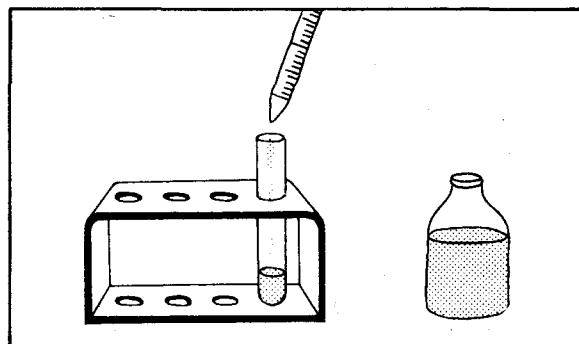
MATÉRIEL

- LCR: centrifuger et utiliser le surnageant
- acide sulfosalicylique à 3% (réactif No. 5)
- réactif de Pandy (réactif No. 44)
- pipettes graduées
- tubes témoins pour protéines (voir page 314).

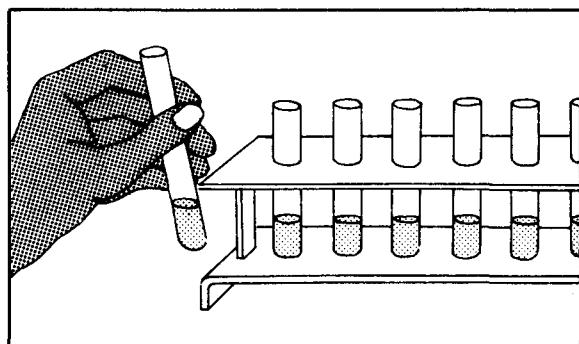


DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES

1. A l'aide d'une pipette, verser 3 ml d'acide sulfosalicylique à 3% dans un tube à essai de mêmes dimensions que les tubes témoins.



2. Ajouter 1 ml de liquide surnageant clair et mélanger. Attendre 5 minutes.
3. Comparer le résultat obtenu aux tubes témoins. Noter le dosage des protéines dans le LCR (en g/l).



Résultats

La teneur normale du LCR en protéines est de 0,1 à 0,45 g/l*.

Elle augmente en cas de:

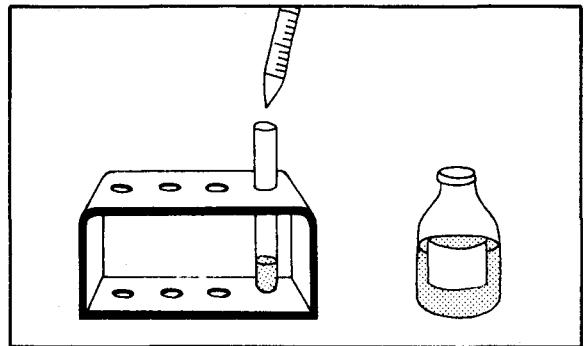
- méningite, hémorragie sub-arachnoïdienne ou compression rachidienne
- trypanosomiase africaine.

*Soit en unités traditionnelles 10 à 45 mg/100 ml.

RÉACTION DE PANDY (GLOBULINES)

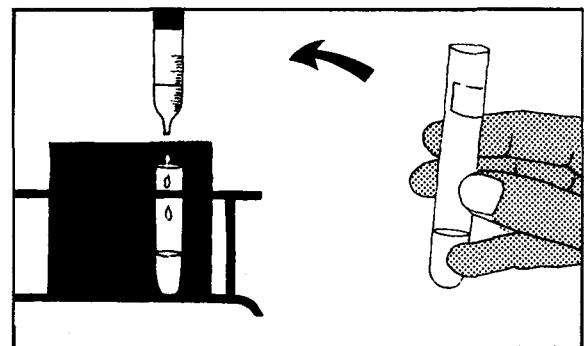
Méthode

1. Mesurer dans un petit tube à essai:
 - 1 ml de réactif de Pandy.



2. Placer le tube devant un morceau de carton noir.
3. Ajouter lentement au compte-gouttes:
 - 3 gouttes de LCR.

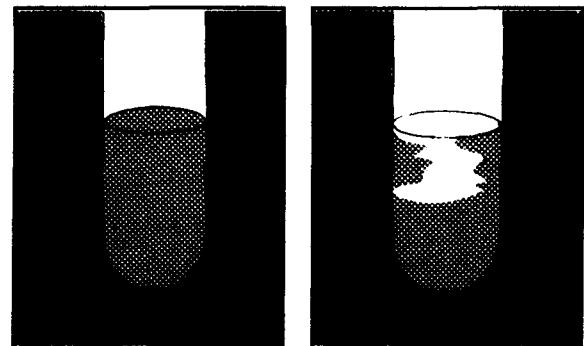
Examiner le contenu du tube après chaque goutte.
4. Lire immédiatement les résultats.



Résultats

Résultat positif

Un précipité blanc se forme quand les gouttes de LCR entrent en contact avec le réactif.



Résultat négatif

Pas de précipité, le mélange reste limpide, ou présente un trouble léger qui se redissout.

Indiquer: réaction de Pandy positive ou réaction de Pandy négative.

15. Examen microscopique du LCR

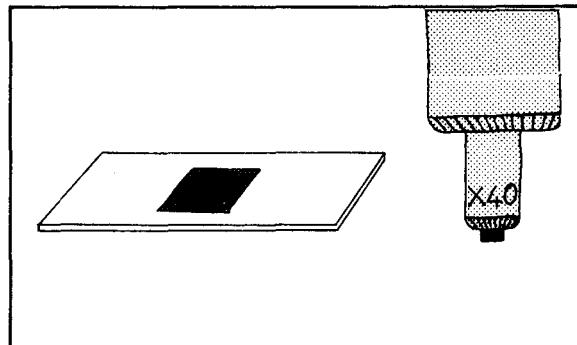
L'examen microscopique du LCR permet notamment:

1. La recherche des trypanosomes dans une préparation à l'état frais, dans les régions où sévit la trypanosomiase africaine.
2. La recherche, dans un étalement coloré au Gram, d'organismes qui provoquent la méningite — méningocoque, pneumocoque, *Haemophilus influenzae*.
3. L'étude d'une coloration de Ziehl-Neelsen, si l'on redoute une méningite.
4. La recherche de champignons, si l'on en soupçonne la présence.

Ces examens sont effectués sur un culot de centrifugation de LCR.

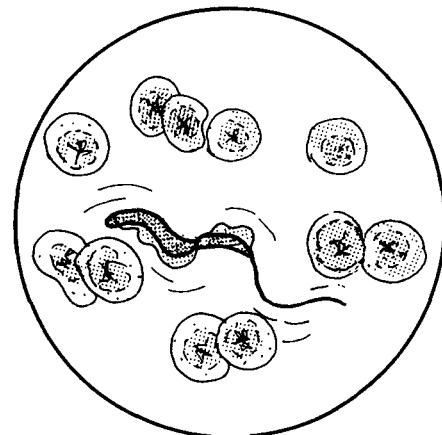
1. PRÉPARATION DIRECTE À L'ÉTAT FRAIS (TRYPANOSOMES)

Placer une goutte de culot de centrifugation de LCR sur une lame et la recouvrir d'une lamelle.
Examiner à l'objectif 40 x.

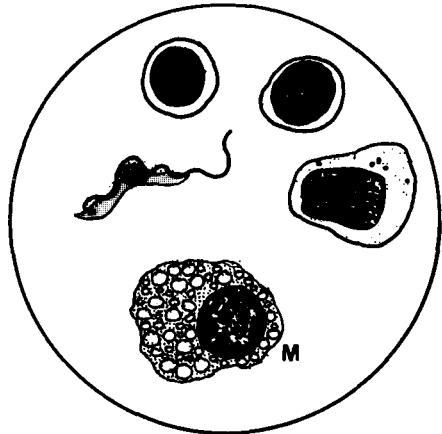


Résultats

La présence de trypanosomes mobiles dans le LCR indique que la maladie en est à son stade ultime et que l'infection a atteint le système nerveux central. Une réaction de Pandy positive permet de conclure à une augmentation de la teneur en protéines du LCR qui contient aussi un plus grand nombre de leucocytes.



Dans une préparation colorée, on peut identifier les leucocytes comme des lymphocytes et observer également quelques cellules de Mott (M). Ce sont de grosses cellules contenant des vacuoles et de grandes quantités d'immunoglobuline M que l'éosine des colorants de Romanowsky colore en sombre (voir page 391).



2. COLORATION DE GRAM (MÉNINGITE)

Faire un étalement de culot de LCR et laisser sécher à l'air.

Faire une coloration de Gram (voir page 235).

Résultats

Tout organisme présent est identifié en fonction de:

- sa réaction au Gram: positive ou négative
- sa morphologie: coques, diplocoques, bacilles, etc.
- la quantité présente.

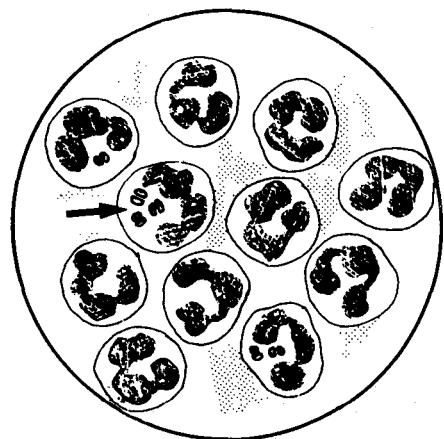
A lui seul, un étalement coloré ne permet pas d'identifier exactement l'espèce. Une culture est indispensable.

Les micro-organismes qui provoquent la méningite sont les suivants:

A. *Méningocoques*

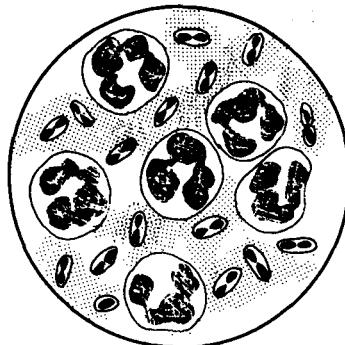
- Gram négatifs
- diplocoques, situés côte à côté
- intracellulaires, à l'intérieur des neutrophiles.

Ils peuvent parfois être extracellulaires et peu nombreux.



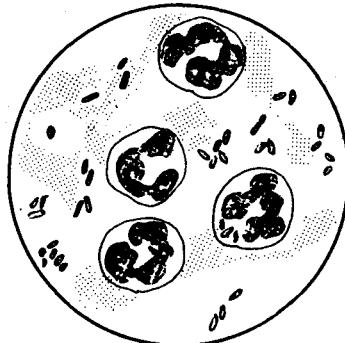
B. *Pneumocoques*

- Gram positifs
- diplocoques aux extrémités se faisant face
- entourés par une capsule que le Gram ne fait pas apparaître
- généralement nombreux.



C. *Haemophilus influenzae* (surtout chez les jeunes enfants)

- Gram négatif
- petits bacilles (coccobacilles)
- pas intracellulaires
- souvent nombreux.



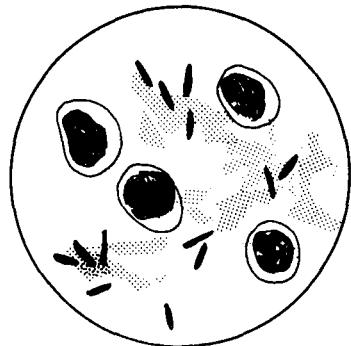
Dans tous les types de méningite susmentionnés, les leucocytes sont des neutrophiles..

Bacilles Gram positifs

Très rares. Il peut s'agir d'une *Listeria*. Culture indispensable.

3. PRÉPARATION DE ZIEHL-NEELSEN (MÉNINGITE TUBERCULEUSE)

Si l'on soupçonne une méningite tuberculeuse, on laisse reposer le LCR et il peut se former un caillot fragile. Le prélever, l'étaler sur une lame et le colorer par la méthode de Ziehl-Neelsen (voir page 249).



Résultats

Si l'on observe la présence de micro-organismes, indiquer "présence de germes acido-résistants".

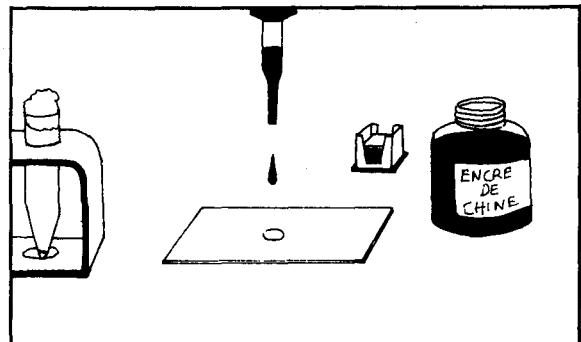
4. CHAMPIGNONS DANS LE LCR

Des champignons (exceptionnellement) peuvent être repérés sur un étalement coloré au Gram.

Cryptococcus neoformans (LCR trouble, avec lymphocytes)

Ajouter:

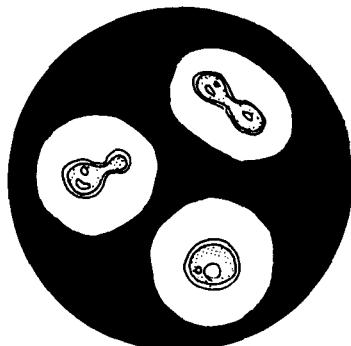
- 1 goutte de culot de centrifugation de LCR
- 1 goutte d'encre de Chine.



Examiner le mélange entre lame et lamelle.

Le champignon se présente sous forme de:

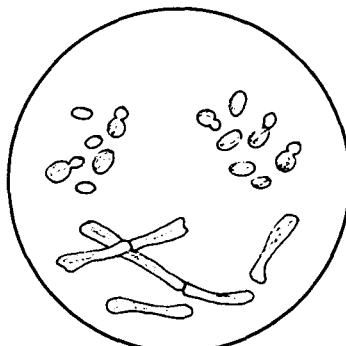
- spores rondes, bourgeonnantes, contenant des granulations grisâtres
- chaque groupe de 1 à 3 spores est entouré d'une capsule incolore.



Candida (LCR clair avec peu de leucocytes)

A l'examen à l'état frais, entre lame et lamelle, sans colorant, on remarque:

- des spores ovales, bourgeonnantes
- des filaments mycéliens courts.



EXPÉDITION DU LCR POUR CULTURE BACTÉRIOLOGIQUE

Avant l'expédition, conserver le LCR dans un incubateur à 37°C. Ne pas mettre au réfrigérateur.

Utiliser, si possible, un milieu "Transgrow" ou, à défaut, un milieu de transport de Stuart (réactif No. 50).

Avec le milieu "Transgrow" (recherche du méningocoque)

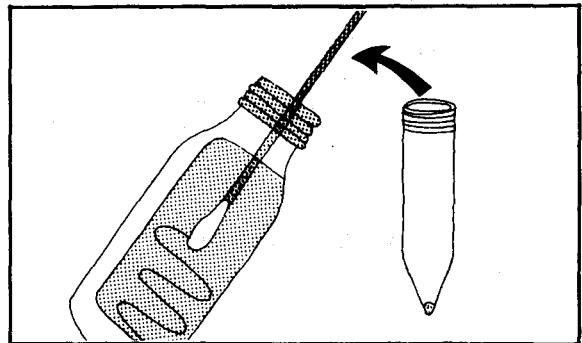
C'est le meilleur procédé, si on dispose de flacons de ce milieu. Il est distribué dans:

- des flacons de 30 ml
- contenant 8 ml de milieu solide, coulé le long d'une paroi d'un flacon plat
- rempli d'un mélange d'air (90%) et de gaz carbonique (10%).

Procéder comme indiqué pour le gonocoque à la page 245.

Si possible, ensemencer avec le culot de centrifugation ou, à défaut, avec le LCR tel quel.

Conservation: jusqu'à 4 jours à température ambiante.



C. HÉMATOLOGIE

16. Les éléments cytologiques du sang

L'hématologie est l'étude du sang, c'est-à-dire des cellules sanguines et du liquide qui les entoure.

LES ÉLÉMENTS CYTOLOGIQUES DU SANG

Ils peuvent être examinés au microscope.

Ils sont de 3 types différents:

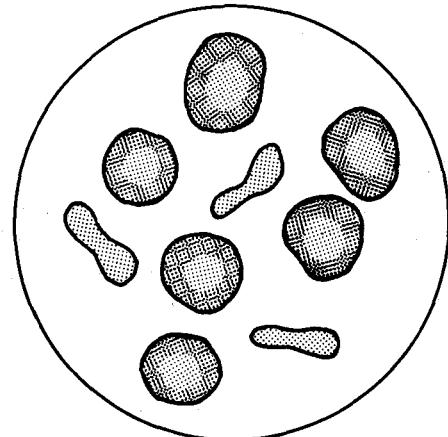
1. *Les globules rouges, appelés aussi hématies ou érythrocytes*

Aspect cellules rondes, remplies d'hémoglobine. Vue de profil, l'hématie ressemble à un disque aminci au centre; elle ne contient pas de noyau.

Taille 7,5 µm

Concentration de nombre environ 5×10^{12} par litre (5 000 000 mm^3) de sang

Rôle Les hématies transportent l'hémoglobine qui se combine avec l'oxygène qu'elles véhiculent des poumons dans les tissus. Elles transportent aussi du gaz carbonique des tissus dans les poumons, éliminant ainsi la principale substance en laquelle la plupart des matières organiques sont métabolisées dans l'organisme.



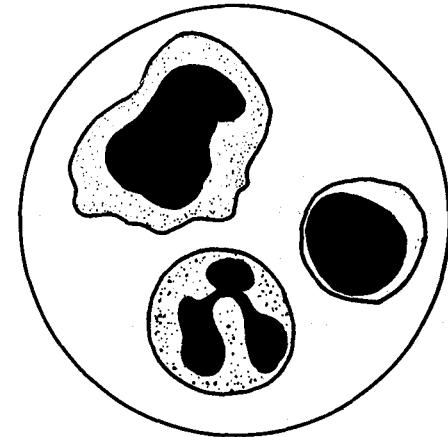
2. *Les globules blancs, ou leucocytes*

Aspect cellule ronde, contenant un noyau et quelques granulations

Taille 9 à 20 µm

Concentration de nombre environ 8×10^9 par litre (8000 par mm^3) de sang

Rôle défense de l'organisme contre l'infection.



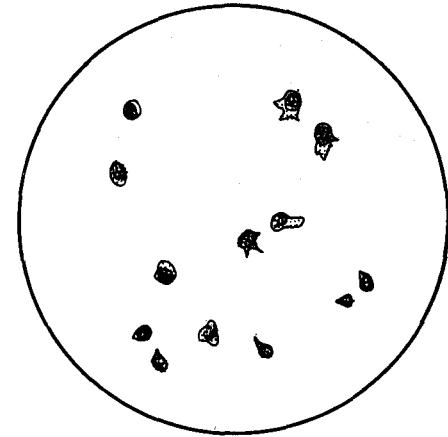
3. *Les plaquettes, ou thrombocytes*

Aspect morceaux de cellule, de forme variable (triangulaire, étoilée, ovale, etc.) avec des granulations

Taille 2 à 5 µm

Concentration de nombre environ 300×10^9 par litre (300 000 par mm^3) de sang

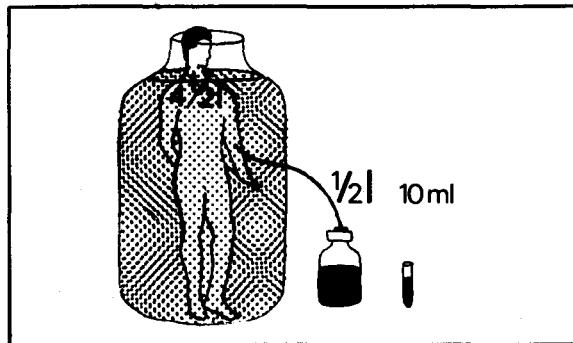
Rôle elles jouent un rôle important dans la coagulation du sang.



Volume du sang dans l'organisme

Le corps d'un adulte pesant 60 kilogrammes renferme environ 4½ litres de sang.

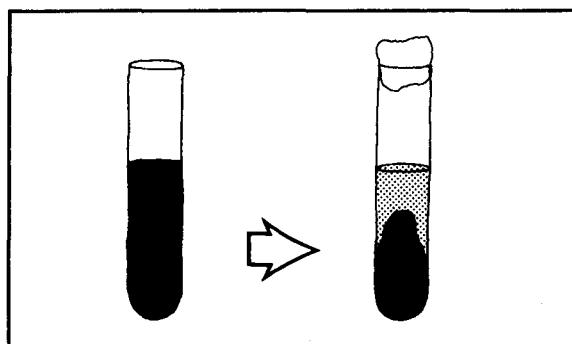
Il peut donc sans aucun danger donner ½ litre de sang pour une transfusion et on peut lui en prendre sans aucun risque 2 tubes de 10 ml pour analyses. Le préciser à tous les malades inquiets lors de prises de sang.



Coagulation du sang

Le sang recueilli dans un tube de verre se solidifie en 5 à 10 minutes et forme un caillot; il a coagulé.

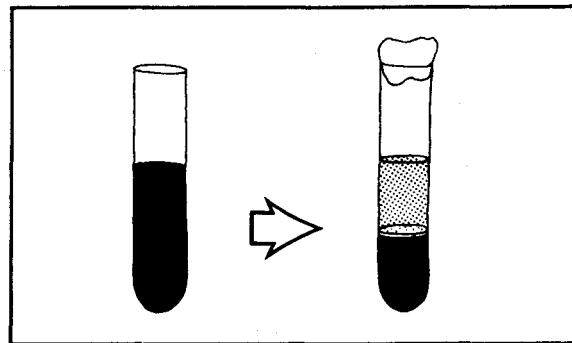
Si on ajoute au sang, aussitôt après prélevement, un anticoagulant spécial, le caillot ne se forme pas et le sang reste liquide. Exemples d'anticoagulants: oxalate fluoruré, citrate trisodique, sel dipotassique de l'acide EDTA, mélange de Wintrobe (voir page 465 et seq.).



Que devient le sang coagulé?

Après plusieurs heures, le sang coagulé se divise en deux parties:

1. un liquide jaune, *le sérum*
2. une masse rouge solide, *le caillot*.



Que devient le sang non coagulé?

Le sang recueilli sur anticoagulant se divise en 2 éléments liquides:

1. un liquide jaune, *le plasma*
2. *les cellules sanguines*, qui ont sédiménté:
 - une mince couche de leucocytes, puis un culot d'hématies.

Quelle différence y a-t-il entre le plasma et le sérum?

- Le plasma contient une protéine soluble, le fibrinogène.
- Le sérum ne contient plus cette substance qui s'est transformée en fibrine insoluble pour former le caillot avec les hématies.

17. Prélèvement de sang veineux

Principe

Le sang veineux est prélevé par ponction d'une veine de l'avant-bras, à l'aide d'une aiguille et d'une seringue.

MATÉRIEL

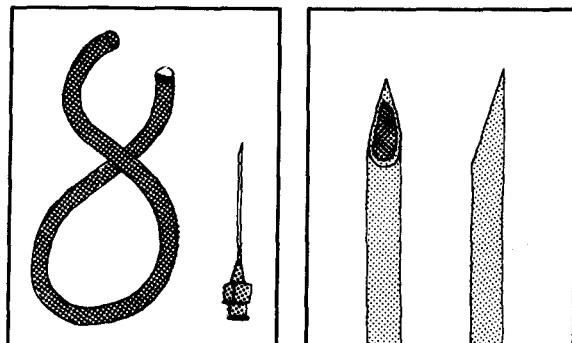
Pour désinfecter la peau

- Alcool à 70% ou teinture d'iode
- Coton hydrophile.

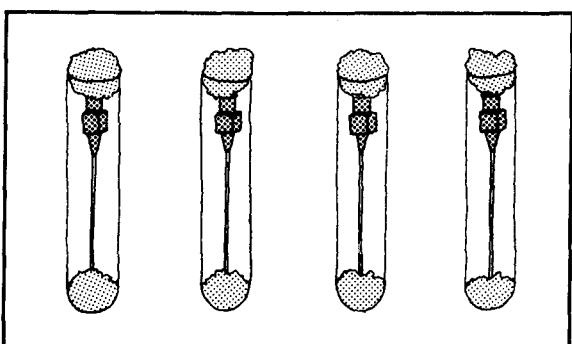
Pour faire la piqûre

- Un garrot, tube de caoutchouc souple de 2 à 5 mm de diamètre.
- Des aiguilles
 - longueur:* 30 à 40 mm
 - diamètre:* 0,9 mm (20 G)*
 - 1,0 mm (19 G)
 - 1,1 mm (18 G)
 - 1,2 mm (18 G)
- biseau:* moyen.

(L'appellation courante des aiguilles précise longueur et diamètre.)
Pour les enfants de moins de 5 ans, on peut utiliser des aiguilles 23 G (0,6 mm) ou 25 G (0,5 mm).



Stocker les aiguilles stériles chacune dans un petit tube de verre: pointe au fond contre un tampon de coton cardé, le tube étant également bouché au coton cardé.



Pour prélever le sang

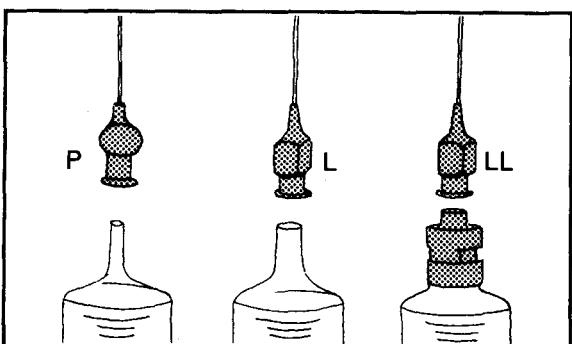
(a) Seringues (de 2, 5, 10 ou 20 ml)

Vérifier que chaque seringue s'adapte à l'aiguille correspondante.

P. = cône de Pravaz-Record

L. = cône Luer (américain)

LL. = cône Luer-Lok.



(b) Flacons ou tubes

Ils doivent soit être vides, soit contenir un anti-coagulant (pour les anticoagulants voir pages 68-69) et porter une marque correspondant à la quantité requise de sang (par exemple à 5 ml).

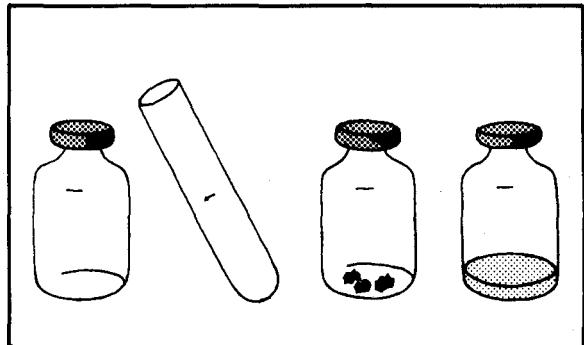
* G = "gauge" — mesure anglo-américaine des diamètres.

MÉTHODE

Lire attentivement la fiche du malade

- Déterminer de combien de sang on a besoin.
- Préparer le flacon ou le tube adéquat à utiliser pour chaque épreuve.

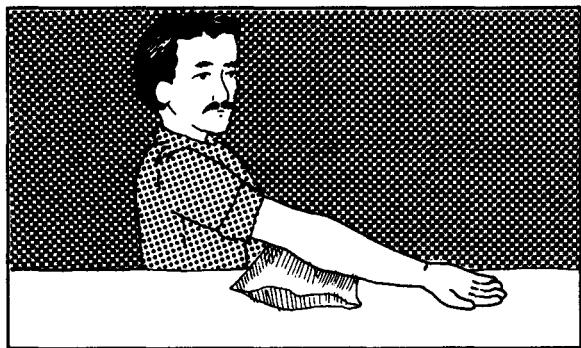
Avant de faire la prise de sang, se laver les mains à l'eau et au savon.



Malade au laboratoire

Le faire asseoir à côté de la table réservée aux prélèvements de sang.

Lui faire poser le bras sur la table, la paume en l'air, sur un petit coussin placé sous le coude.



Malade alité

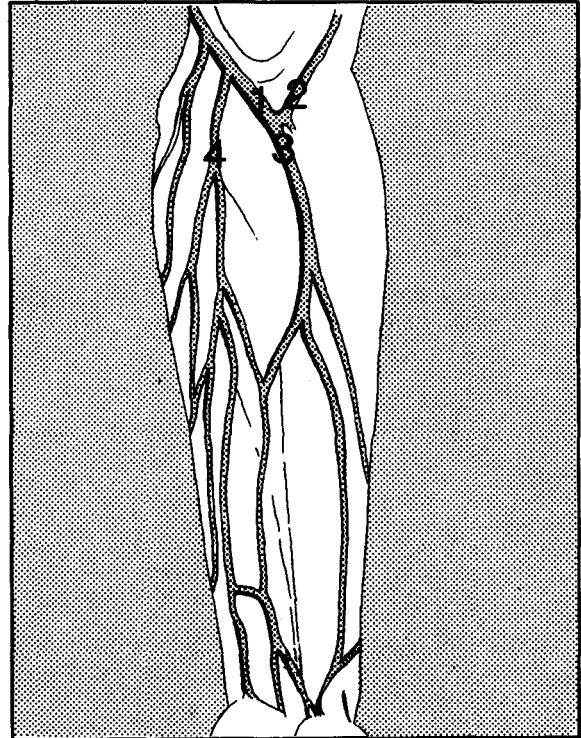
Lui faire bien tendre le bras.



Où prélever le sang

C'est la veine du pli du coude qui est le point le mieux situé, à l'emplacement le plus visible et le plus épais, de préférence dans l'une des branches de l'Y formé — un peu au-dessus du point de jonction 1.

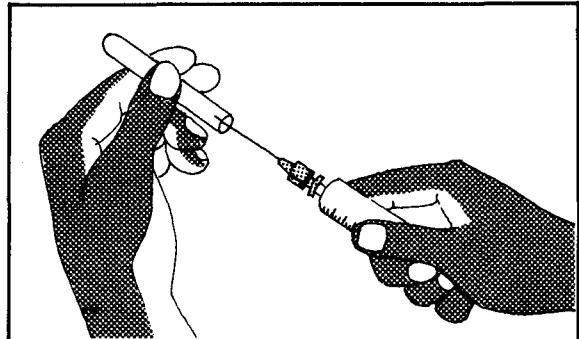
On peut aussi piquer, le cas échéant, aux emplacements 2, 3 et 4.



Avec une seringue

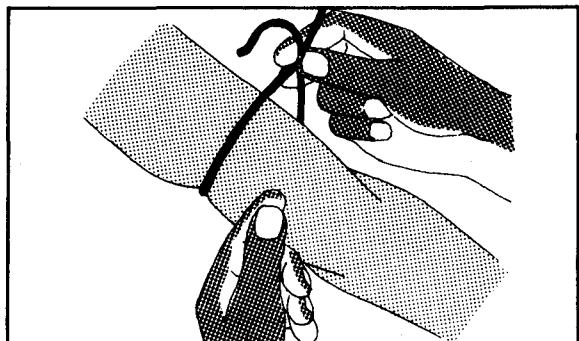
1. Ajuster l'aiguille à la seringue, en ne touchant que l'embase de l'aiguille. Vérifier l'aiguille et la seringue pour s'assurer que l'aiguille n'est pas bloquée et que la seringue est étanche.

Placer la pointe de l'aiguille dans le tube stérile jusqu'au moment de l'utiliser.

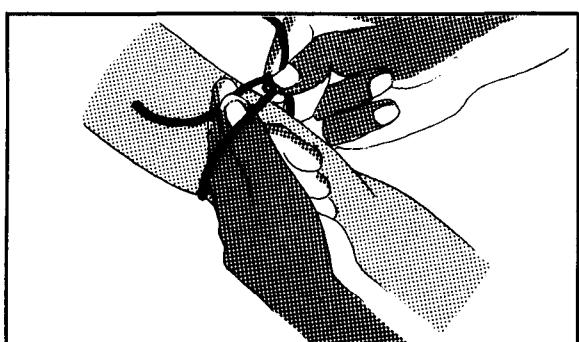


Placer le garrot.

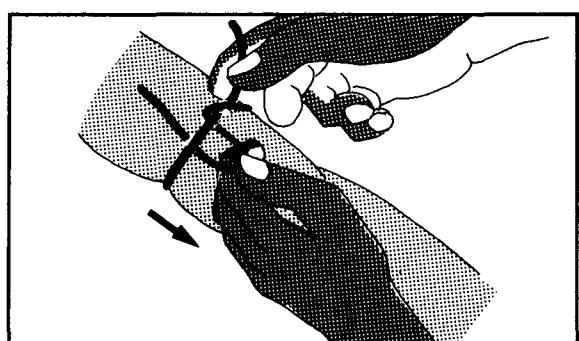
2. De la main droite, tenir les bouts du garrot serré, autour du bras.



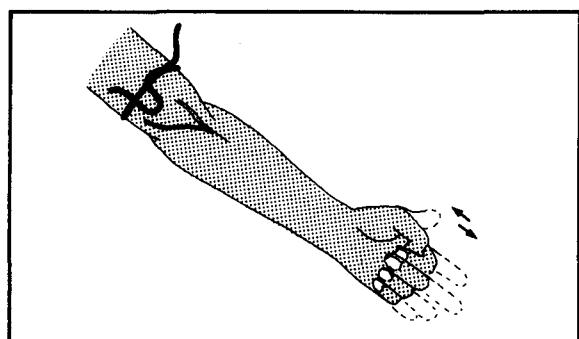
3. De la main gauche, saisir un bout du garrot et le tirer.



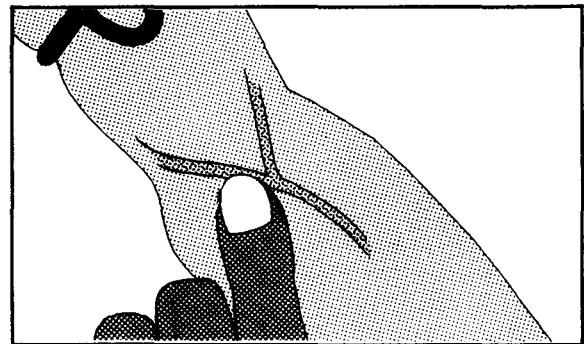
4. Le replier au-dessous du garrot serré. Le garrot doit être juste assez serré pour ralentir l'afflux de sang et détendre les veines, sans pour autant ralentir la circulation sanguine dans les artères.



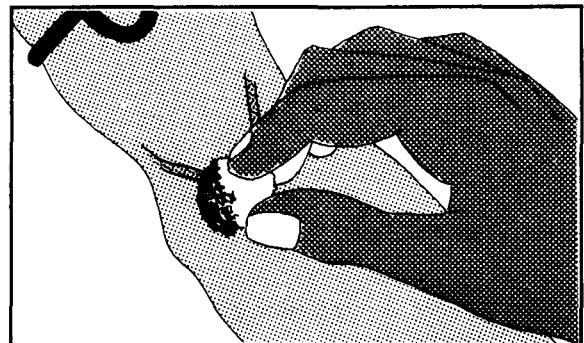
5. Faire serrer le poing au malade plusieurs fois de suite pour faire saillir les veines.



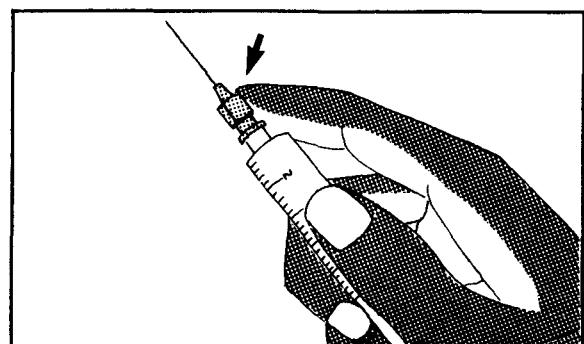
6. Avec l'index gauche repérer l'emplacement exact de la veine à piquer.



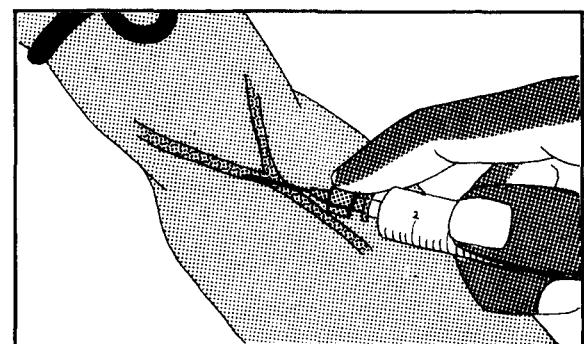
7. Désinfecter la peau avec un tampon de teinture d'iode ou d'alcool.



8. Tenir la seringue dans la main droite, l'embase appuyée contre le bout de l'index droit.

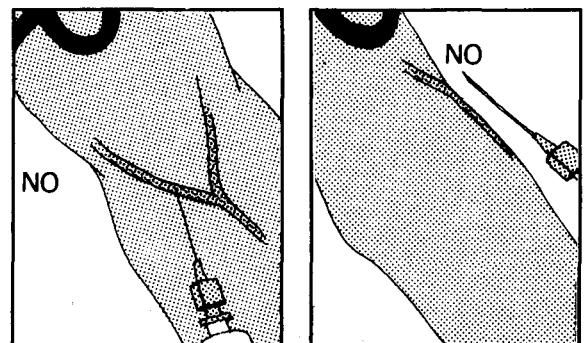


9. Placer l'aiguille le biseau tourné vers le haut.
L'enfoncer au centre de la veine, sans hésiter.



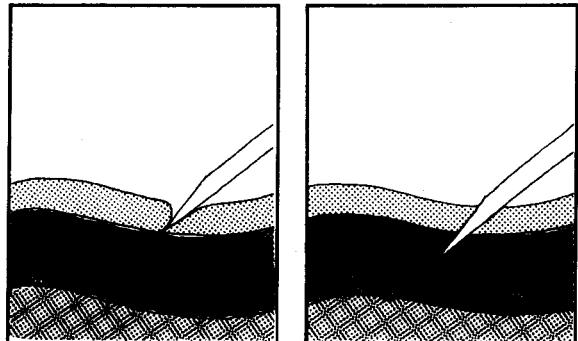
Attention:

Ne jamais aborder une veine par le côté.
Ne jamais piquer avec le biseau de l'aiguille tourné vers le bas.

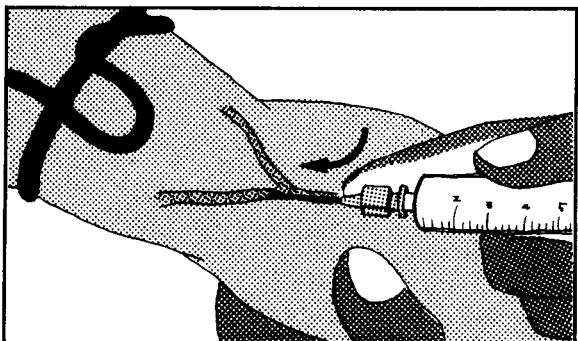


On perçoit que l'on traverse:

- (a) la paroi de la peau qui résiste
- (b) puis la paroi de la veine qui résiste moins (tissu plus souple).

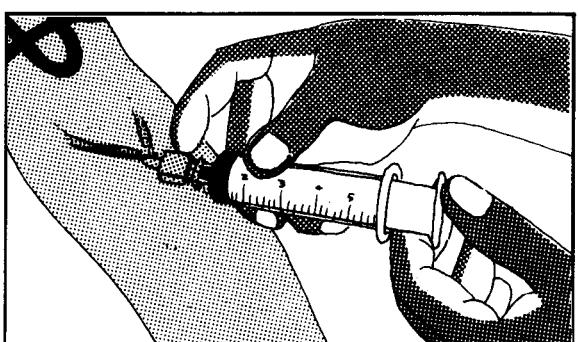


10. Enfoncer l'aiguille de 1 à 1,5 cm le long de la veine.

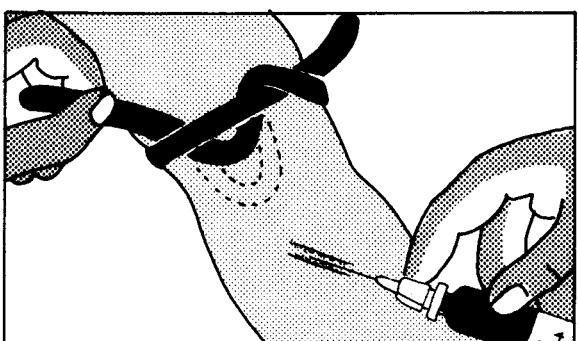


11. De la main gauche, tirer légèrement le piston de la seringue, dans laquelle le sang doit apparaître.

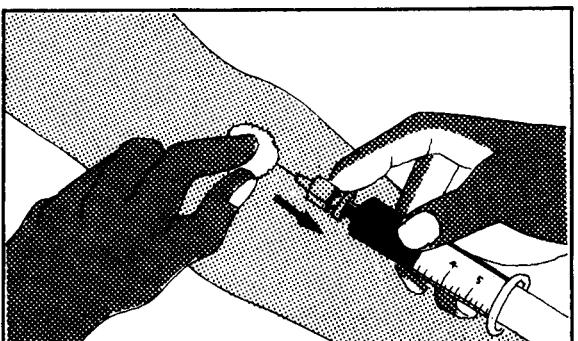
Continuer à tirer lentement le piston pour remplir la seringue de sang.



12. Enlever alors le garrot, en tirant sur le bout replié.

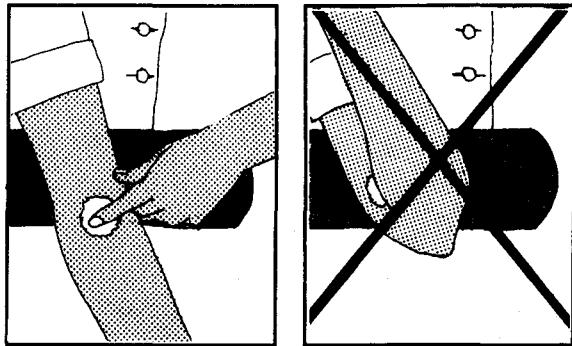


13. Placer un tampon sec là où l'aiguille est enfoncée.
Retirer l'aiguille d'un coup sec d'en dessous du tampon.

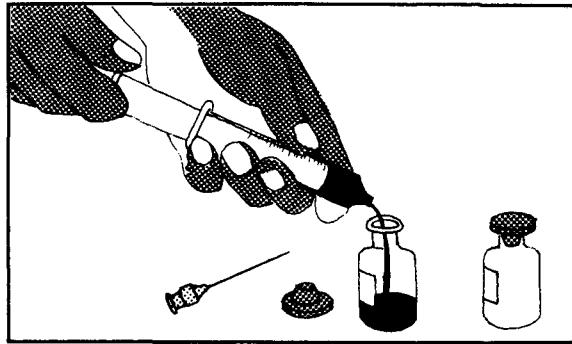


14. Demander au malade de maintenir (avec son autre main) le coton sur la piqûre pendant 3 minutes, bras toujours tendu.

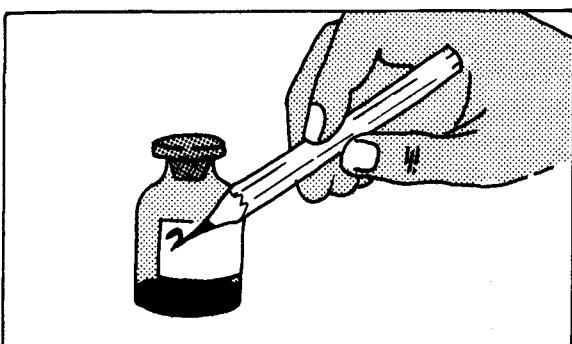
Il n'est plus conseillé de faire replier le bras sur le tampon d'alcool (risque d'hématome).



15. Enlever l'aiguille de la seringue.
Remplir jusqu'à la marque les tubes ou flacons prévus.
Retourner plusieurs fois de suite ceux qui contiennent de l'anticoagulant.



16. Incrire clairement sur les flacons:
— le nom du malade
— la date
— le numéro du malade, la consultation ou le service, si possible.
Rincer aussitôt seringue et aiguille à l'eau froide.



PRÉLÈVEMENT DE SANG CAPILLAIRE

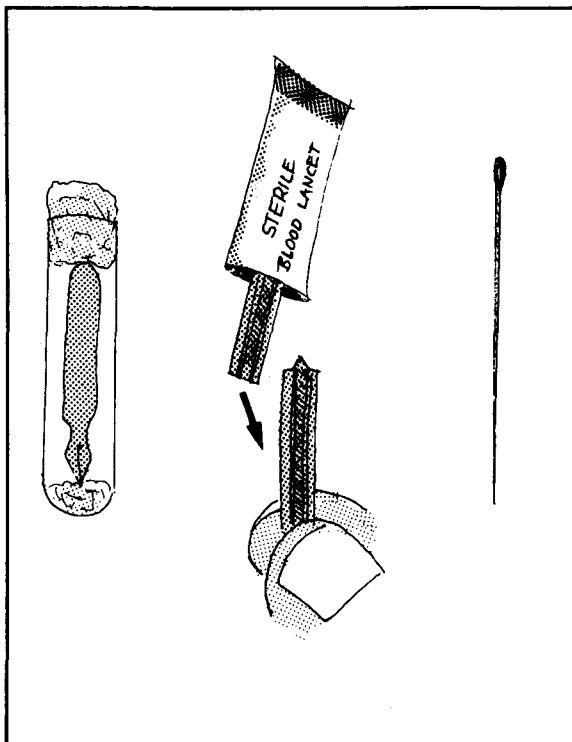
Le prélèvement de quelques gouttes de sang du doigt (ou de l'orteil chez les nourrissons) est suffisant pour différents examens de laboratoire comme:

- concentration globulaire (numération globulaire)
- fraction de volume érythrocytaire
- dosage de l'hémoglobine
- recherche de parasites.

On peut utiliser:

- des vaccinostyles à jeter
- des lancettes stériles
- des aiguilles chirurgicales de type Hagedorn (No. 7 ou 8).

Pour la technique de prélèvement du sang capillaire, voir page 189.



STÉRILISATION DES LANCETTES ET DES AIGUILLES

Placer lancettes et aiguilles propres dans des petits tubes en verre, bouchés au coton cardé, et les stériliser à l'autoclave ou au stérilisateur à chaleur sèche.

18. Concentration leucocytaire (numération des leucocytes)

Le nombre de leucocytes (globules blancs) contenus dans un litre de sang s'appelle la concentration leucocytaire. (Dans les unités traditionnelles, il est exprimé en nombre de globules par millimètre cube et appelé numération leucocytaire ou numération des globules blancs. Dans le système SI, il s'agit d'une concentration de nombre.)

Principe

Le sang est dilué à l'aide d'un diluant leucocytaire qui:

- hémolyse (détruit) les hématies
- laisse intacts les leucocytes.

On compte alors les leucocytes dans une cellule, au microscope, et on en calcule le nombre par litre de sang.

Intérêt

Dans différentes maladies, le nombre de leucocytes du sang est modifié. Il peut par exemple augmenter très sensiblement.

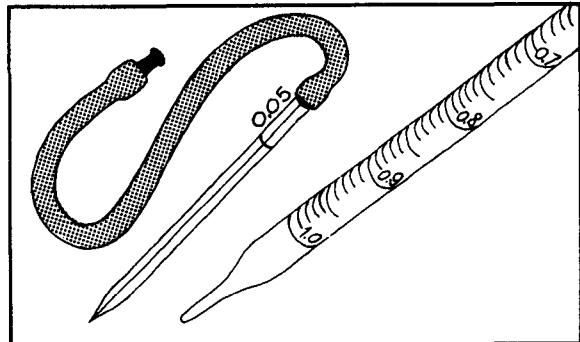
MATÉRIEL

Pipettes

1. Pipette pour sang graduée à $50\text{ }\mu\text{l}$ ($0,05\text{ ml}$ ou 50 mm^3), avec tube de caoutchouc terminé par un embout.

Les pipettes à bulbe sont déconseillées, car elles sont imprécises, difficiles à employer et à nettoyer, et plus coûteuses.

2. Pipette graduée d'1 ml.

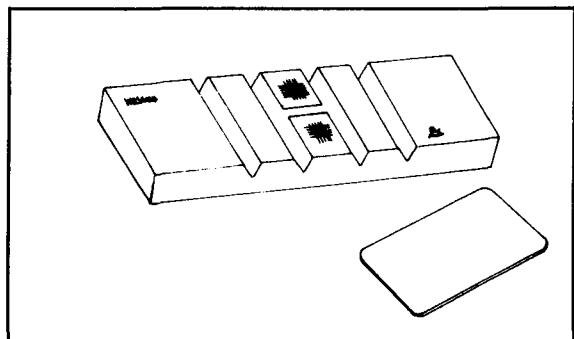


On peut utiliser différents types de cellules hématimètres, notamment:

- celle de Neubauer améliorée, de préférence "à lignes brillantes"
- celle de Bürker.

La cellule de Thoma n'a qu'une petite zone quadrillée et n'est donc pas à conseiller.

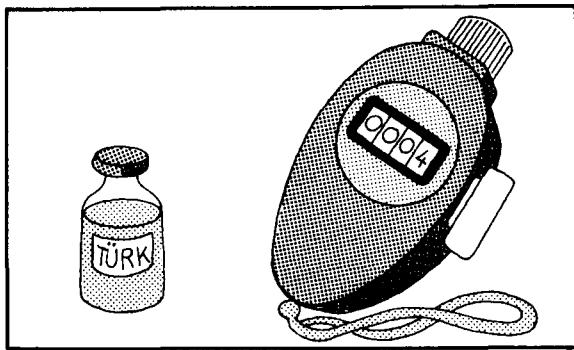
La cellule est fournie avec une lamelle spéciale.



Liquide diluant

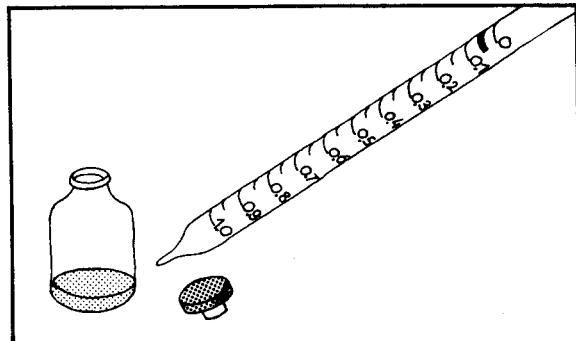
- Solution de Türk (réactif No. 53)

Compteur à main, si possible.

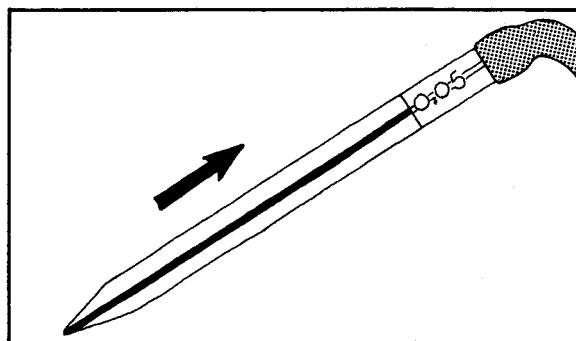


MÉTHODE

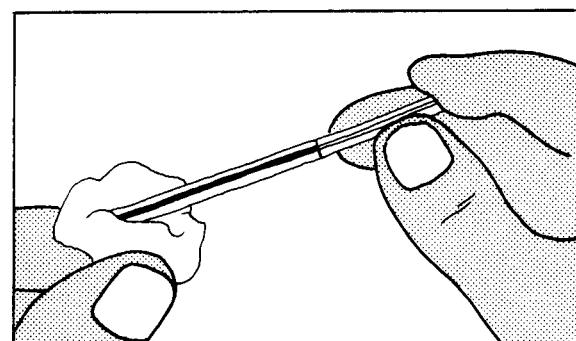
1. A l'aide d'une pipette graduée d'1 ml, verser 0,95 ml de diluant dans un petit flacon.



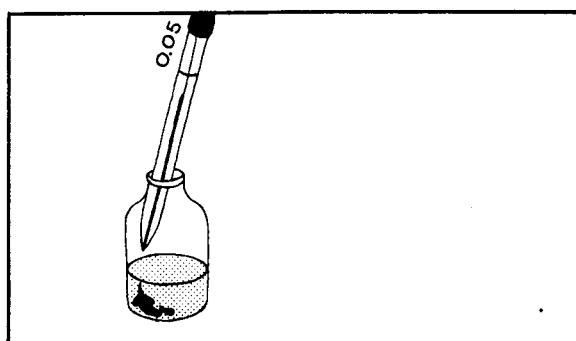
2. Aspirer du sang veineux ou capillaire jusqu'à la marque 0,05 ml de la pipette pour sang. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. Si l'on utilise du sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé à l'anticoagulant (voir page 68) en renversant le flacon à plusieurs reprises, pendant une minute, immédiatement avant de prélever à la pipette.



3. Essuyer extérieurement la pipette avec du papier absorbant. S'assurer que le niveau du sang coïncide avec le repère.

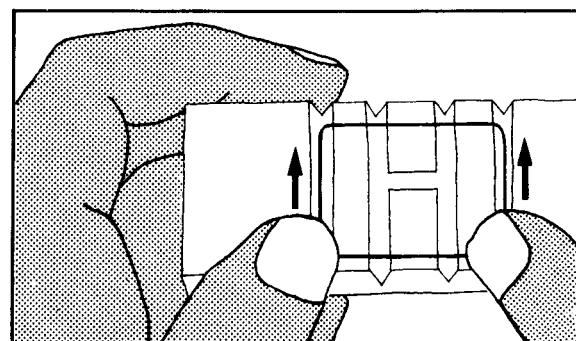


4. Souffler le sang dans le flacon contenant le diluant. Rincer la pipette en aspirant et en refoulant le liquide à 3 reprises.
La dilution de sang est de 1:20.
Inscrire le nom et le numéro du malade sur le flacon.



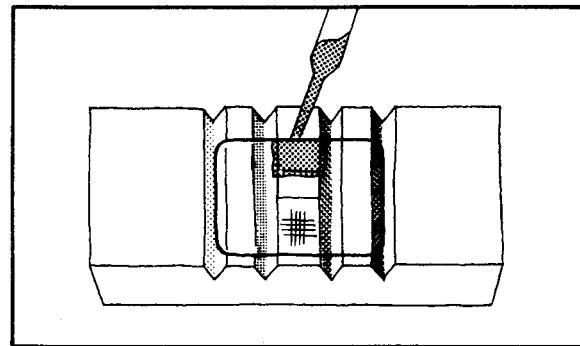
5. Fixer avec soin la lamelle à la cellule en exerçant une pression suffisante.

Quand la lamelle est bien en place, on voit apparaître des bandes colorées, dites anneaux de Newton, entre les deux surfaces vitrées.



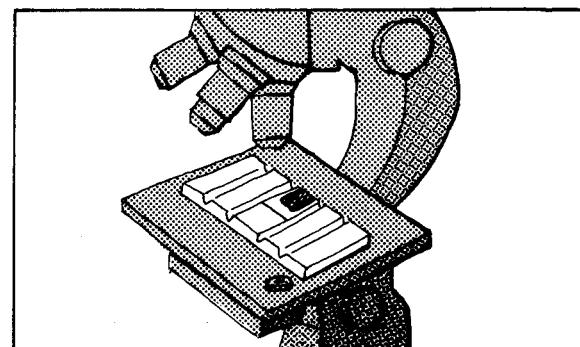
6. Bien mélanger le sang dilué.
A la pipette Pasteur, remplir une chambre de la cellule, en prenant garde de ne pas dépasser la partie lignée.

Attention: Si le liquide déborde de la zone située entre les 2 chambres, recommencer l'opération:
retirer la lame, la nettoyer ainsi que la cellule, et
remettre une nouvelle goutte de sang.



7. Laisser reposer 3 minutes pour permettre aux globules de se déposer.
8. Mettre la cellule sur la platine du microscope.
Utiliser l'objectif 10 x (oculaires 6 x ou 10 x).
Réduire la quantité de lumière pénétrant dans le condenseur en modifiant le diaphragme de l'iris.
Mettre au point sur les lignes de la cellule et sur les leucocytes.

Ne pas prendre des grains de poussière pour des leucocytes.



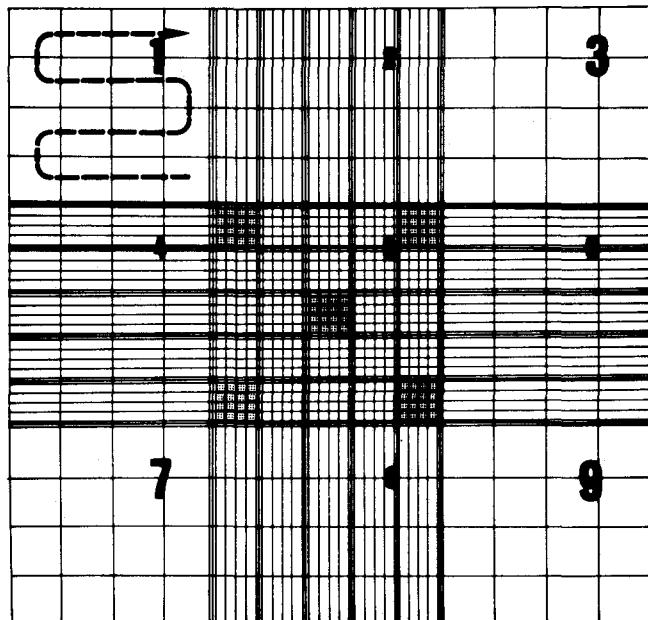
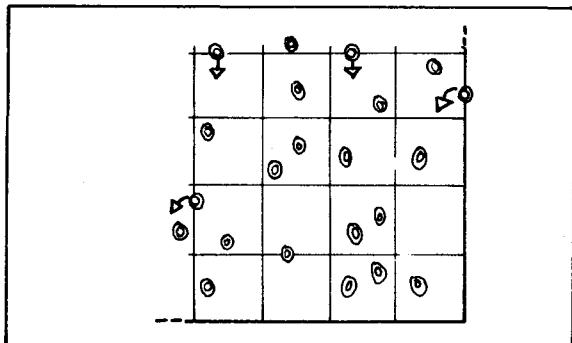
Numération des leucocytes

(a) Avec la cellule hématimètre de Neubauer (améliorée)

- Superficie de la chambre = 9 mm^2
- Profondeur de la chambre = $0,1 \text{ mm}$

Compter les leucocytes dans une zone de 4 mm^2 en utilisant les carrés numérotés 1, 3, 7 et 9, comme indiqué sur le schéma.

Pour ceux qui sont à cheval sur les lignes, les compter comme s'ils appartenaient au carré situé à gauche ou en dessous, comme dans le schéma ci-après, qui reproduit l'un des grands carrés 1, 3, 7 ou 9.



Calcul du nombre de leucocytes contenus dans 1 litre de sang: *

- Multiplier le nombre de leucocytes comptés dans les 4 carrés par 0,05
- Noter le résultat "nombre $\times 10^9 / 1$ "

Exemple:

Nombre de leucocytes comptés = 188

Nombre de leucocytes dans 1 litre = $(188 \times 0,05) \times 10^9$

Résultat: $9,4 \times 10^9 / 1$

Explication du calcul

Chacun des quatre carrés dans lesquels sont comptés les leucocytes couvre 1 mm^2 , soit au total une surface de 4 mm^2 . La profondeur de la cellule est de $0,1 \text{ mm}$, et le volume dans lequel sont comptés les leucocytes est donc $4 \times 0,1 = 0,4 \text{ mm}^3$. Ainsi, en divisant par 4 et en multipliant par 10 on obtiendra le nombre de leucocytes dans 1 mm^3 de sang dilué. Comme la dilution est de 1:20, en multipliant par 20, on obtiendra le nombre de leucocytes contenus dans 1 mm^3 de sang pur. Enfin, comme il y a 1 million (10^6) de millimètres cubes dans 1 litre, en multipliant par 10^6 on aura le nombre de leucocytes par litre de sang pur.

Tout ceci peut se résumer comme suit:

$$\begin{aligned}\text{Nombre de leucocytes par litre} &= \frac{\text{nombre de leucocytes comptés} \times 10 \times 20}{4} \times 10^6 \\ &= \text{nombre de leucocytes comptés} \times 50 \times 10^6 \\ &= \text{nombre de leucocytes comptés} \times 0,05 \times 10^9\end{aligned}$$

Exemple:

On a compté 188 leucocytes dans les 4 carrés. Leur nombre par millimètre cube de sang pur est donc

$$\frac{188 \times 10 \times 20}{4} (= 188 \times 50 = 9400)$$

et leur nombre par litre: $\frac{188 \times 10 \times 20}{4} \times 10^6 = 9400 \times 10^6 = 9,4 \times 10^9$

*Le calcul et l'exemple sont donnés en unités SI. Toutefois, le texte mentionne aussi l'unité traditionnelle (nombre de globules par millimètre cube) chiffre obtenu en multipliant par 50 le nombre de globules comptés.

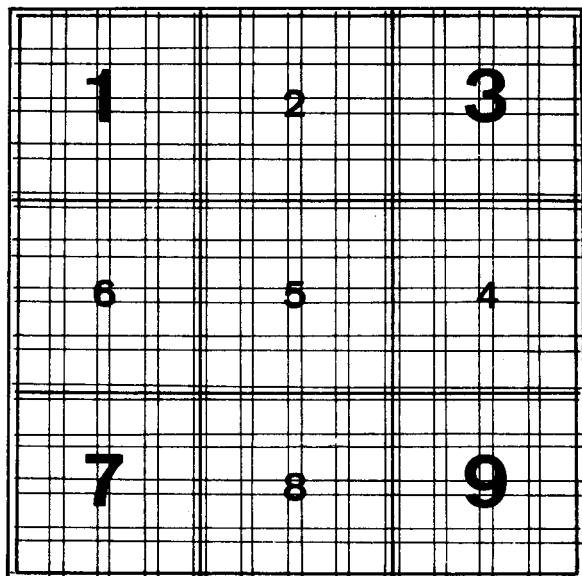
(b) Avec la cellule hématimètre de Bürker

- Superficie de la chambre = 9 mm^2
- Profondeur de la chambre = $0,1 \text{ mm}$

Compter les leucocytes dans une zone de 4 mm^2 , en utilisant les carrés numérotés 1, 3, 7 et 9, comme indiqué sur le schéma.

Tenir compte des leucocytes situés à cheval sur les lignes de chaque carré compté (voir page 363).

Calcul et exemple: comme pour la cellule de Neubauer.



Note: Si on utilise une cellule-hématimètre de Malassez: celle-ci est divisée en 100 rectangles de $1/100\text{mm}^3$, dont 25 sont divisés en 20 carrés pour faciliter le comptage. Une bande de 10 rectangles correspond à $1/10\text{mm}^3$. Pour la numération des érythrocytes, compter au moins 5 rectangles ($1/20\text{mm}^3$), en comptant les érythrocytes à cheval sur 2 rectangles. Multiplier le total des 5 rectangles par 20 puis par le taux de dilution du sang, pour obtenir le nombre d'érythrocytes par mm^3 .

RÉSULTATS

Chiffres normaux

	Unités SI (nbre de leuc $\times 10^9$ par litre)	Unités traditionnelles (nbre de leuc par mm^3)
Hommes et femmes	4-10	4 000-10 000
Enfants de 10 ans	4-10	4 000-10 000
Enfants de 3 ans	4-11	4 000-11 000
Nourrissons (3 à 9 mois)	4-15	4 000-15 000
Nouveau-nés	10-20	10 000-12 000

Chiffres élevés

On appelle *leucocytose* un accroissement du nombre de leucocytes dans le sang circulant. Elle peut être due à certaines infections bactériennes pyogéniques. Dans la leucémie, on peut constater des concentrations leucocytaires allant de $50 \times 10^9/\text{l}$ à $400 \times 10^9/\text{l}$ ($50\ 000/\text{mm}^3$ à $400\ 000/\text{mm}^3$), voire davantage. Il convient alors, lorsqu'on calcule la concentration de nombre, d'utiliser une dilution plus élevée — par exemple 0,05 ml de sang et 1,95 ml de diluant, soit une dilution de 1:40. En ce cas, le nombre de leucocytes comptés sera multiplié non plus par 0,05 mais par 0,1, pour donner le nombre multiplié par 10^9 par litre (dans le système traditionnel, multiplier par 100 au lieu de 50 pour obtenir le nombre par millimètre cube).

Chiffres faibles

On appelle *leucopénie* une diminution du nombre de leucocytes dans le sang circulant. Elle peut accompagner certaines infections comme la typhoïde ou le paludisme. Elle paraît également à la suite de l'absorption de certains médicaments. Quand la concentration leucocytaire est très faible, il faut utiliser une dilution moindre, par exemple 0,05 ml de sang pour 0,45 ml de diluant, soit une dilution de 1:10. En ce cas, le nombre de leucocytes comptés sera multiplié non plus par 0,5 mais par 0,25 pour donner le chiffre $\times 10^9$ par litre (dans le système traditionnel, multiplier par 25 au lieu de 50 pour obtenir le nombre par millimètre cube).

Correction pour hématies nucléées

Normalement il n'y a pas dans le sang d'hématies nucléées, notamment de normoblastes (voir page 403). Mais elles peuvent apparaître dans certaines maladies comme les anémies à hématies falciformes et d'autres anémies hémolytiques. Les normoblastes ne sont pas hémolysés dans le liquide diluant et sont donc comptés avec les leucocytes. Quand ils sont présents en grand nombre, la concentration leucocytaire doit être corrigée comme suit.

Examiner un étalement mince de sang coloré au Romanowsky (voir page 393) et compter le nombre de normoblastes pour 100 leucocytes.

*Calcul**

Concentration de normoblastes (par litre):

$$\frac{\text{Nombre de normoblastes comptés}}{100 + \text{Nbre de normoblastes comptés}} \times \text{concentration leucocytaire}$$

Exemple

Si l'on a compté 50 normoblastes et que la concentration leucocytaire est $16 \times 10^9/\text{l}$, la concentration de normoblastes est:

$$\frac{50}{100 + 50} \times 16 = 5,3 \times 10^9/\text{l}$$

et la concentration leucocytaire après correction $16 - 5,3 = 10,7 \times 10^9/\text{l}$.

*Dans le système traditionnel, les concentrations de normoblastes et de leucocytes sont exprimées par millimètre cube. En ce cas, le calcul de l'exemple ci-dessus serait:

$$\frac{50}{100 + 50} \times 16\ 000 = 5\ 300/\text{mm}^3$$

Numération leucocytaire après correction = $16\ 000 - 5\ 300 = 10\ 700/\text{mm}^3$.

19. Concentration érythrocytaire (numération des hématies)

On appelle concentration érythrocytaire le nombre d'érythrocytes (globules rouges, hématies) contenus dans 1 litre de sang. (Avec les unités traditionnelles, elle est exprimée en nombre de globules par millimètre cube et appelée numération érythrocytaire. Dans le système SI, il s'agit d'une concentration de nombre.) Elle est difficile à calculer de façon précise avec une cellule, aussi est-il conseillé de déterminer plutôt la fraction de volume érythrocytaire (hématocrite) et de doser l'hémoglobine. Cependant, pour les cas où l'on ne peut calculer cette fraction de volume, on exposera ci-après la marche à suivre pour établir la concentration érythrocytaire.

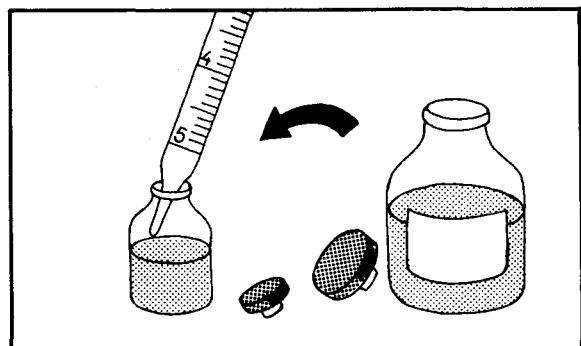
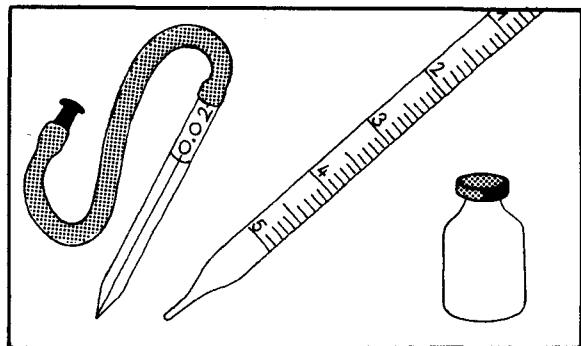
Principe

Le sang est dilué dans un liquide approprié.

On compte les hématies au microscope, dans une cellule hématomètre, et on calcule le nombre par litre de sang.

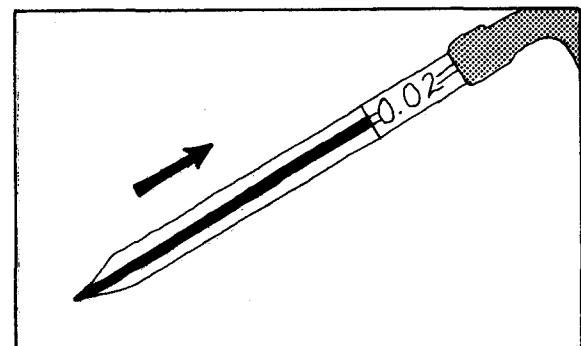
MATÉRIEL

- Pipettes:
 - (a) pipette pour sang (souvent appelée pipette de Sahli), graduée à 0,02 ml (20 mm^3 ou $20 \mu\text{l}$), avec tube en caoutchouc terminé par un embout.
L'utilisation de pipettes à bulbe n'est pas recommandée, car elles sont peu précises, difficiles à employer et à nettoyer, et plus coûteuses.
 - (b) pipette graduée de 5 ml.
- Cellule-hématomètre. Il en existe de plusieurs types; c'est la cellule améliorée de Neubauer qui sera décrite ici.
- Liquide diluant — solution de formol citraté (réactif No. 27).
- Compteur à main, si possible.



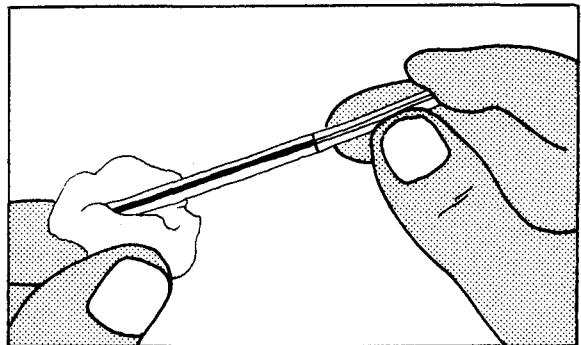
MÉTHODE

1. A l'aide de la pipette graduée de 5 ml, verser 4,0 ml de diluant dans un petit flacon.



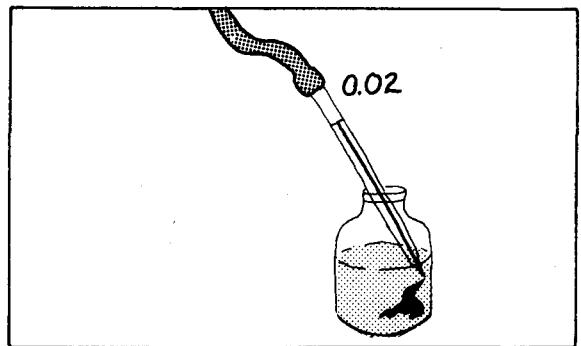
2. Aspirer du sang veineux ou capillaire jusqu'à la marque 0,02 de la pipette pour sang. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. Si l'on utilise du sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé à l'anticogulant (voir page 68) en renversant le flacon à plusieurs reprises, pendant une minute, immédiatement avant de prélever à la pipette.

3. Essuyer extérieurement la pipette avec du papier absorbant.
S'assurer que le niveau du sang coïncide toujours avec le repère.

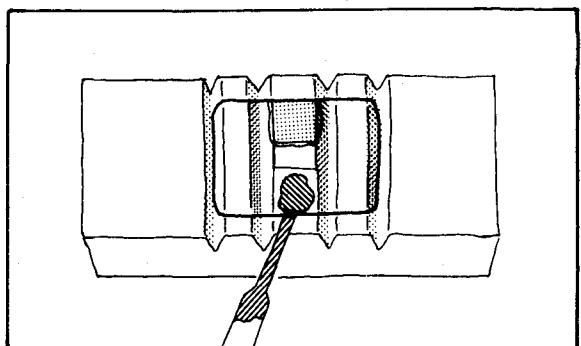


4. Souffler le sang dans le flacon contenant le diluant. Rincer la pipette en aspirant et en refoulant le liquide à 3 reprises.
La dilution de sang est de 1:200.

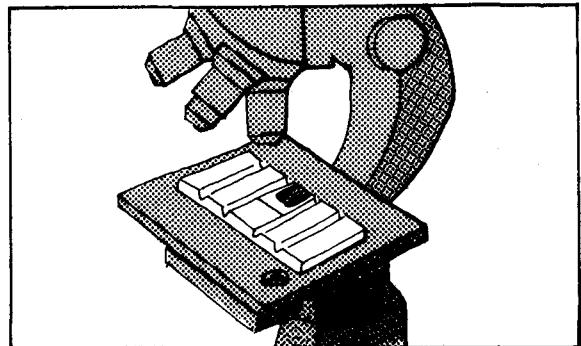
Inscrire le nom et le numéro du malade sur le flacon.



5. Fixer la lamelle à la cellule, comme il est dit page 361. Bien mélanger le sang dilué.
A la pipette Pasteur, remplir les deux chambres de la cellule, en prenant garde de ne pas dépasser les zones quadrillées.



6. Laisser reposer 3 minutes pour permettre aux globules de se déposer.
7. Mettre la cellule sur la platine du microscope. A l'aide de l'objectif 10 x, trouver le carré central de la cellule, puis passer à l'objectif 40 x pour compter les hématies.



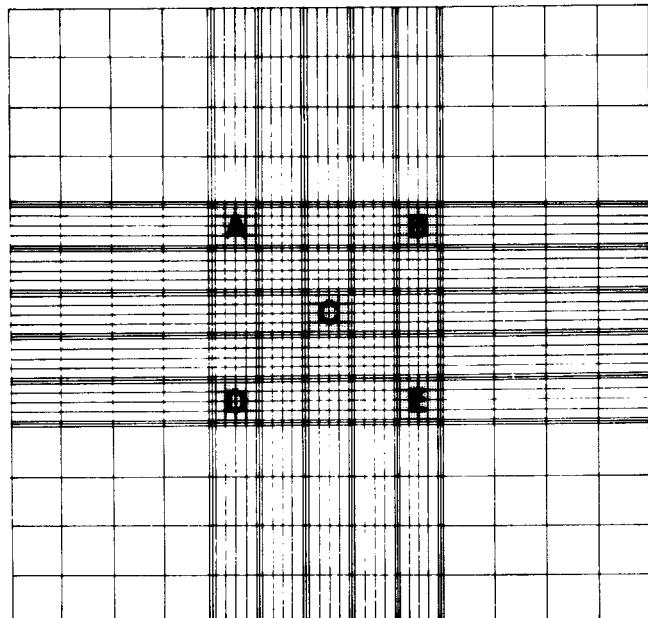
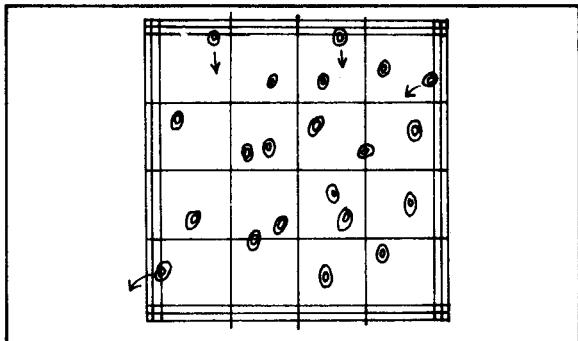
Numération des hématies

Utiliser une cellule lignée améliorée de Neubauer:

Compter les hématies dans une zone de $0,2 \text{ mm}^2$, en utilisant les carrés marqués A, B, C, D et E.

Pour les hématies placées à cheval sur deux carrés, les compter comme indiqué ci-dessous.

Ce carré reproduit l'un des cinq considérés (A, B, C, D ou E).



Note: Pour la cellule de Malassez, compter les cellules nucléées dans 10 bandes (1 mm^3), et multiplier le total des 10 bandes obtenu par le taux de dilution du sang pour obtenir le nombre de leucocytes par mm^3 .

Calcul du nombre d'hématies contenues dans 1 litre de sang:

- Multiplier par 0,01 le nombre d'hématies comptées dans le premier groupe de cinq carrés.
- Faire de même pour le deuxième groupe de cinq carrés.
- Faire la moyenne de ces deux chiffres.
- Noter le résultat "nombre $\times 10^{12}/\text{l}$ ".

Exemple:

Nombre d'hématies comptées dans (a) la première chambre quadrillée = 390

Nombre d'hématies comptées dans (b) la deuxième chambre quadrillée = 370

Nombre d'hématies par litre (a) = $(390 \times 0,01) \times 10^{12} = 3,9 \times 10^{12}$

Moyenne (résultat noté) = $3,8 \times 10^{12}/\text{l}$.

Explication du calcul

Chacun des quatre carrés dans lesquels sont comptées les hématies couvre $0,04 \text{ mm}^2$, soit une superficie totale de $0,2 \text{ mm}^2$. La profondeur de la cellule est de $0,1 \text{ mm}$, et le volume dans lequel sont comptées les hématies est donc de $0,2 \times 0,1 = 0,02 \text{ mm}^3$. Ainsi, en divisant par 2 et en multipliant par 100 (c'est-à-dire en multipliant par 50), on obtiendra le nombre d'hématies par millimètre cube de sang dilué. La dilution étant de 1:200, en multipliant par 200 on obtiendra le nombre d'hématies par millimètre cube de sang dilué. Enfin, comme il y a 1 million (10^6) de millimètres cubes dans 1 litre, en multipliant par 10^6 on obtiendra le nombre d'hématies contenues dans 1 litre de sang pur. Tout ceci peut se résumer comme suit:

$$\begin{aligned}\text{Nombre d'hématies par millimètre cube} &= \text{nombre d'hématies comptées} \times 50 \times 200 \\ &= \text{nombre d'hématies comptées} \times 10\,000\end{aligned}$$

La concentration érythrocytaire est si élevée qu'il est plus facile de la noter en millions.

$$\begin{aligned}\text{Nombre d'hématies par millimètre cube} &= \frac{\text{nombre d'hématies comptées} \times 10\,000}{1\,000\,000} \text{ millions} \\ &= (\text{nombre d'hématies comptées} \times 0,01) \text{ millions} \\ &= (\text{nombre d'hématies comptées} \times 0,01) \times 10^6\end{aligned}$$

Le nombre d'hématies dans 1 litre sera égal à 10^6 fois ce chiffre, soit:

$$\begin{aligned}\text{Nombre d'hématies par litre} &= \text{nombre d'hématies comptées} \times 0,01 \times 10^6 \times 10^6 \\ &= \text{nombre d'hématies comptées} \times 0,01 \times 10^{12}\end{aligned}$$

Exemple:

On a compté 390 hématies dans le premier groupe de cinq carrés. Leur nombre dans 1 mm^3 de sang pur est donc $390 \times 0,01 \times 10^6 = 3,9$ millions. La concentration par litre de sang pur est $390 \times 0,01 \times 10^{12}$, ou, $3,9 \times 10^{12}/\text{l}$.

RÉSULTATS

Concentrations normales

Unités SI: hématies $\times 10^6$ par litre	Unités traditionnelles: millions d'hématies par millimètre cube
--	---

Hommes	4,5-5,5	4,5-5,5
Femmes	4,0-5,0	4,0-5,0
Enfants (4 ans)	4,2-5,2	4,2-5,2
Nourrissons (1 à 6 mois)	3,8-5,2	3,8-5,2
Nouveau-nés	5,0-6,0	5,0-6,0

Relevons que les chiffres sont les mêmes en unités SI et en unités traditionnelles, soit $5,0 \times 10^{12}/\text{l}$ ou 5,0 millions/mm³, encore que, en unités traditionnelles, on écrive parfois tous les zéros, par exemple 5 000 000/mm³.

Concentrations faibles

Malades atteints d'anémie due à une perte d'hématies ou à une hémolyse des hématies.

Concentrations élevées

Malades déshydratés ou atteints de polycythémie.

NETTOYAGE DU MATERIEL

1. Matériel et produits de nettoyage

On doit pouvoir disposer d'une gamme de produits variés pour l'entretien de tout le matériel: pipettes, hématomètre, lamelles, etc. Les produits recommandés ici sont tous d'usage courant et faciles à trouver:

- poire en caoutchouc et, si possible, trompe à vide
 - bêchers de 500 et 50 ml
 - alcool à 95°. Ether. Acétone

acide acétique 5 ml

 - solution aqueuse d'acide acétique à 0,5%: eau distillée 1 000 ml.
 - mélange sulfo-chromique (réactif No. 51)
 - si possible, bicarbonate de soude.

2. Pipettes: nettoyage quotidien

(a) *Trempage*

Faire tremper les pipettes dans de l'eau ordinaire propre.

(b) *Nettoyage*

A l'aide d'une trompe à vide ou d'une poire en caoutchouc, aspirer dans chaque pipette:

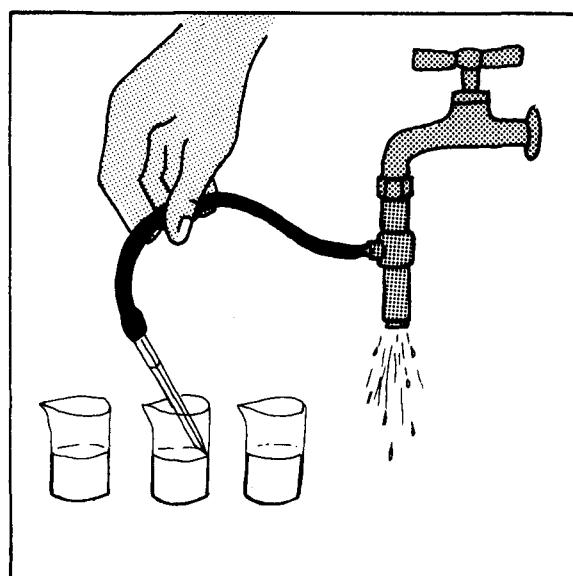
- de l'acide acétique dilué (3 fois)
- de l'eau propre, de l'eau distillée si disponible en abondance (4 fois)
- de l'air (pipette tenue la pointe en haut)
- de l'acétone (1 fois)
- de l'air (pour un séchage aussi complet que possible).

(c) Séchage

Si possible à l'incubateur, à 37°C, en y laissant les pipettes toute la nuit dans un récipient garni de coton cardé.

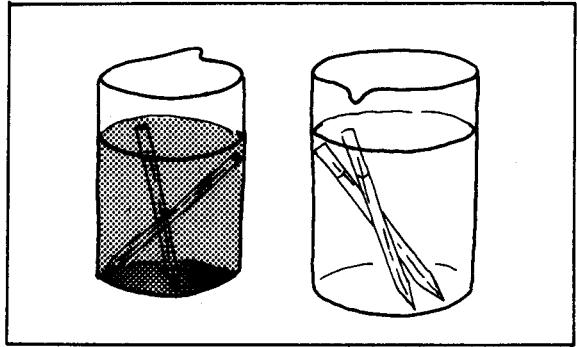
Si l'on veut réutiliser immédiatement une pipette, la passer:

- à l'eau, distillée de préférence
 - à l'éther
 - la sécher complètement à l'air.



3. *Pipettes: nettoyage mensuel (ou plus fréquent, le cas échéant)*

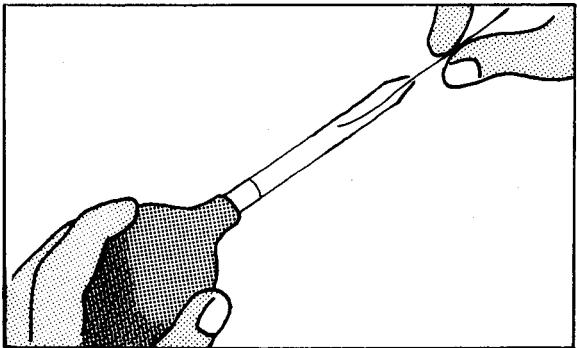
- (a) Faire tremper les pipettes pendant 12 heures environ dans un bêcher plein de mélange sulfo-chromique.
- (b) Les rincer extérieurement, puis intérieurement à l'eau du robinet.
- (c) Les plonger pendant 12 heures dans un bêcher rempli d'une solution faible de bicarbonate de soude (10 g/l environ, soit 1%).
- (d) Les nettoyer comme il est dit plus haut sous "nettoyage quotidien".



4. *Pipettes bouchées*

Essayer d'enfoncer un crin de nylon fin (type 000) par le haut de la pipette tout en aspirant par la pointe.

En cas d'échec, laisser tremper pendant 12 heures dans un bêcher de mélange sulfo-chromique.



5. *Nettoyage des cellules hématimètres et des lamelles*

Nettoyer le plus vite possible après usage:

- Faire tremper 2 à 3 heures dans une solution détergente.
- Bien rincer sous le jet du robinet.
- Rincer si possible à l'alcool.
- Sécher à l'aide d'un chiffon doux.

Ne jamais utiliser de poudre abrasive qui rayerait la surface quadrillée.

Après plusieurs épreuves, nettoyer le plus vite possible en rinçant à l'eau et en essuyant avec un chiffon propre et doux. Une fois par mois, la cellule exige un nettoyage plus approfondi comme décrit ci-dessus.

20. Hémoglobine : dosage de la cyanméthémoglobin, méthode photométrique

L'hémoglobine est le pigment rouge des hématies. Elle est formée de chaînes protéïniques et de molécules renfermant du fer. Elle apporte l'oxygène aux cellules tissulaires du corps.

Unités de mesure

A strictement parler, l'unité SI qui exprime les concentrations d'hémoglobine est la millimole par litre (mmol/l). Quand on l'utilise, il faut préciser à quelle structure chimique elle s'applique. En pratique, cela signifie que l'on devrait employer l'expression "hémoglobine (Fe)", au lieu de dire simplement "hémoglobine". Toutefois, à titre provisoire, en attendant d'adopter la millimole par litre, certains laboratoires utilisent l'unité "gramme par litre" (g/l). En ce cas, le terme "hémoglobine" suffit et il n'est pas nécessaire de préciser "hémoglobine (Fe)". On peut convertir en millimoles par litre les valeurs exprimées en grammes par litre en les multipliant par 0,062. Exemple:

$$\text{hémoglobine } 150 \text{ g/l} \times 0,062 = \text{hémoglobine (Fe) } 9,3 \text{ mmol/l}$$

Dans ce Manuel, les calculs et valeurs sont généralement exprimés sous ces deux formes. Il convient de noter que si l'on utilise l'unité "gramme par litre", les valeurs sont 10 fois supérieures à l'unité traditionnelle "gramme par 100 ml". Ainsi, $150 \text{ g/l} = 15,0 \text{ g/100 ml}$.

Principe

Le sang est dilué dans du réactif de Drabkin, qui hémolyse les hématies, les transformant en cyanméthémoglobin. La solution obtenue est examinée au spectrophotomètre. Sa densité optique est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine du sang.

Cette méthode est celle qui donne les estimations d'hémoglobine les plus précises. Elle doit être préférée aux autres dans toute la mesure possible.

MATÉRIEL

- Photocolorimètre* ou spectrophotomètre
- Pipettes
 - (a) Pipette pour sang (Sahli) graduée à 0,02 ml (20 mm^3 ou $20 \mu\text{l}$), avec tube en caoutchouc et embout
 - (b) Pipette graduée de 5 ml
- Tubes à essai
- Diluant de Drabkin (réactif No. 18).

Ce réactif peut être acheté en poudre ou en comprimés à dissoudre dans 1 litre d'eau distillée. Si l'on possède une balance de précision, on peut le fabriquer au laboratoire (voir réactif No. 18). Il peut être conservé 1 mois dans un flacon brun. Si la solution devient trouble, la jeter.

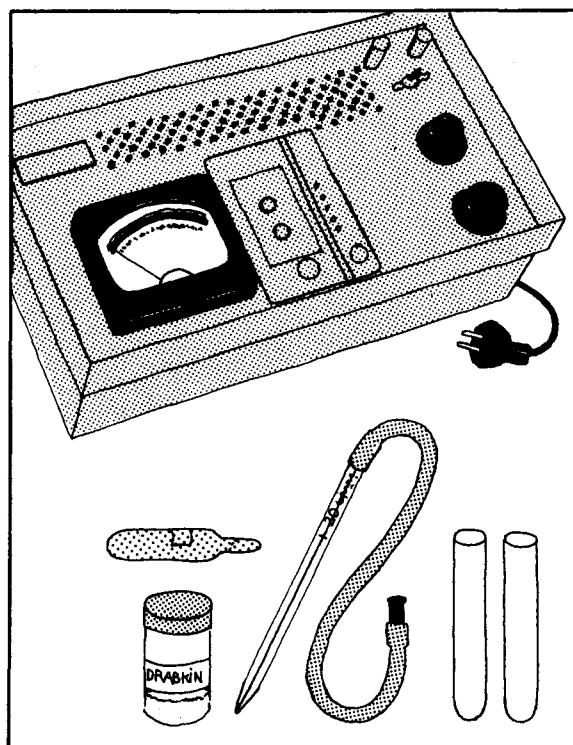
On ne doit pas laisser congeler le réactif de Drabkin, car il en résulterait une décoloration avec réduction du ferricyanure.

- Cyanméthémoglobin de référence (étalon)

Peut être achetée, ou obtenue auprès d'un laboratoire de référence.

La concentration d'une solution de référence du commerce est généralement donnée en milligrammes pour 100 ml (indiquée le plus souvent en mg%).

*On peut utiliser un appareil fonctionnant sur courant électrique ou sur batterie d'automobile. L'UNICEF en possède un modèle dont la référence est 09.309.98 (110 V – batterie) ou 09.310.00 (220 V – batterie).



ETALONNAGE DU COLORIMETRE

Avant de pouvoir utiliser le colorimètre pour le dosage de l'hémoglobine, il faut préparer une courbe d'étalonnage. A partir de cette courbe, on pourra tracer un graphique et dresser un tableau indiquant les quantités d'hémoglobine.

Méthode

1. A l'aide de la formule ci-après, calculer la teneur en hémoglobine de la solution de référence, en grammes par litre:

$$\frac{\text{concentration en mg/100 ml} \times 10}{1000} \times 251$$

(Note: 10 est le facteur de conversion de 100 ml en 1 litre, 1000 est le facteur de conversion des milligrammes en grammes et 251 le facteur de dilution de 0,02 ml de sang dilués avec 5 ml de réactif de Drabkin.)

Etant donné que $10 \times 251 / 1000$ est très près de 2,5, la formule ci-dessus peut être simplifiée comme suit:
teneur en hémoglobine d'une solution de référence en grammes par litre = concentration en mg/100 ml \times 2,5

Exemple

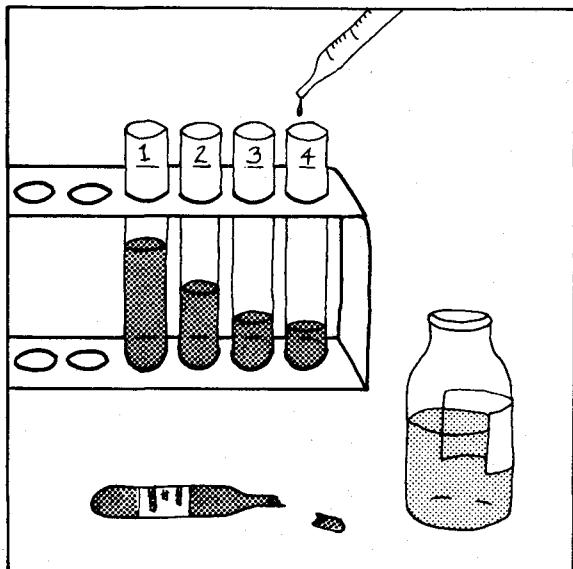
Concentration de la solution de référence = 60 mg/100 ml

$$\begin{aligned}\text{Teneur en hémoglobine} &= 60 \times 2,5 \\ &= 150 \text{ g/l}\end{aligned}$$

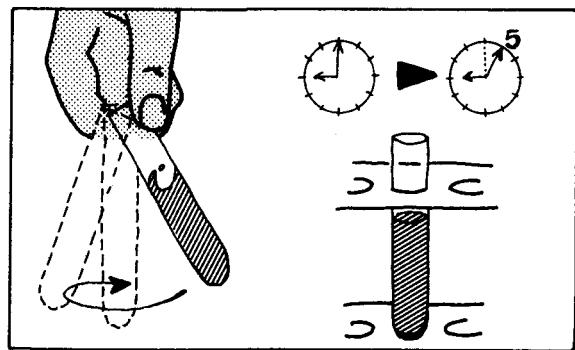
*Si l'on utilise une dilution de 1:200 (soit 0,02 ml de sang pour 4 ml de réactif de Drabkin), multiplier par 2,0 au lieu de 2,5.

2. Faire une série de dilutions de la solution étalon:
 - préparer 4 tubes et les numérotter de 1 à 4
 - à l'aide d'une pipette, y verser le mélange suivant:

Numéro du tube	1	2	3	4
Solution étalon	4,0 ml	2,0 ml	1,3 ml	1,0 ml
Diluant de Drabkin	—	2,0 ml	2,7 ml	3,0 ml
Dilution de la solution étalon	Solution pure	1:2	1:3	1:4



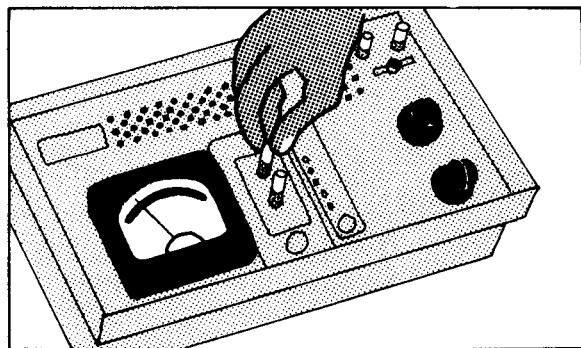
3. Mélanger et laisser reposer 5 minutes.



4. Lire les dilutions au colorimètre:

- placer un écran vert (Ilford No. 625) dans le colorimètre ou fixer la longueur d'ondes à 540 nanomètres (nm)
- remplir de réactif de Drabkin un tube à essai ou une cuve de mesure et le mettre dans le colorimètre
- mettre le colorimètre à zéro
- lire les densités optiques des tubes 1 à 4, en utilisant un tube à essai ou une cuve de mesure.

S'assurer que l'aiguille revient à zéro entre chaque lecture.



5. Préparer un graphique en comparant les lectures des solutions étalons à celles des concentrations.

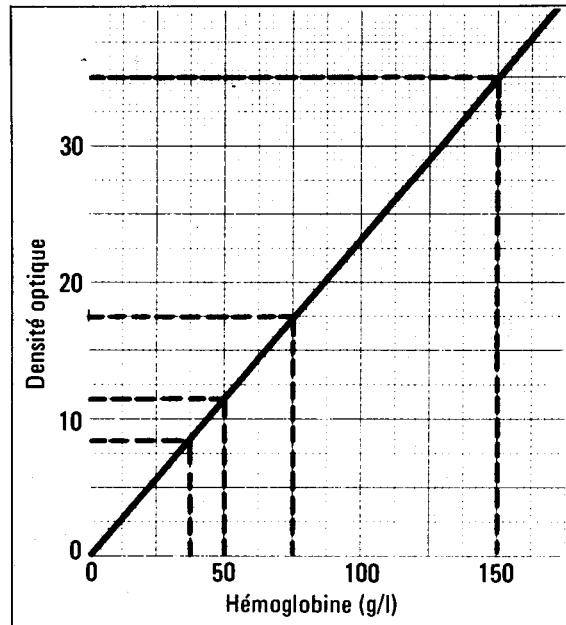
Exemple

Concentration de la solution de référence calculée pour 15 g/l

Etalon: Dilution	Concentration d'hémoglobine (g/l)	Densité optique
Solution pure	150	35,0
1:2	$\frac{150}{2} = 75$	17,5
1:3	$\frac{150}{3} = 50$	11,5
1:4	$\frac{150}{4} = 37,5$	8,5

6. A partir du graphique:

- dresser un tableau des teneurs en hémoglobine allant de 20 à 180 g/l.



Attention:

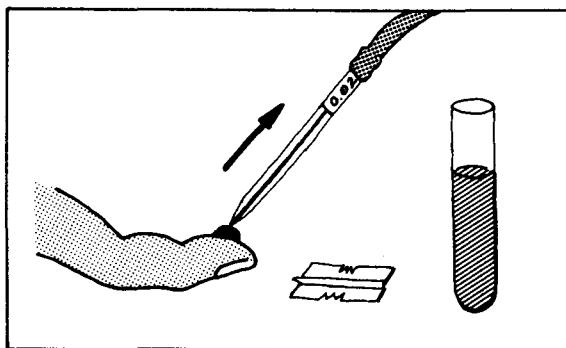
Au début de chaque journée de travail:

- nettoyer les tubes à essai ou les cuves de mesure du colorimètre
- remplir de réactif de Drabkin l'un des tubes nettoyés pour remettre à zéro le colorimètre
- lire une solution de référence, soit:
 - (a) la solution de référence fraîche de cyanméthémoglobin utilisée pour étalonner l'appareil, soit
 - (b) une solution de référence préalablement étalonnée par rapport à la cyanméthémoglobin étalon.

DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE À PARTIR DE SANG DES MALADES (cyanméthémoglobine)

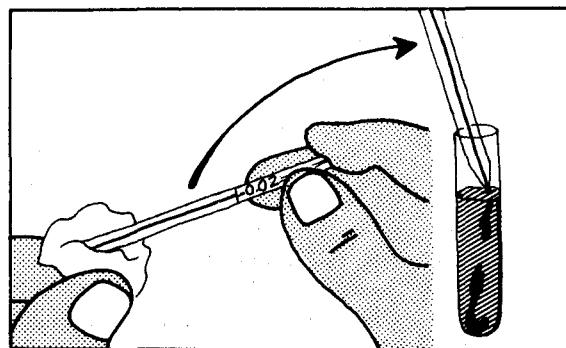
1. A l'aide d'une pipette, verser 5 ml de réactif de Drabkin dans un tube à essai.

A la pipette de Sahli, aspirer du sang veineux ou capillaire jusqu'à la marque 0,02 ml. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. S'il s'agit de sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé en renversant le flacon qui le contient avec l'anticoagulant (voir page 68), à plusieurs reprises, pendant 1 minute, juste avant de le prélever à la pipette.

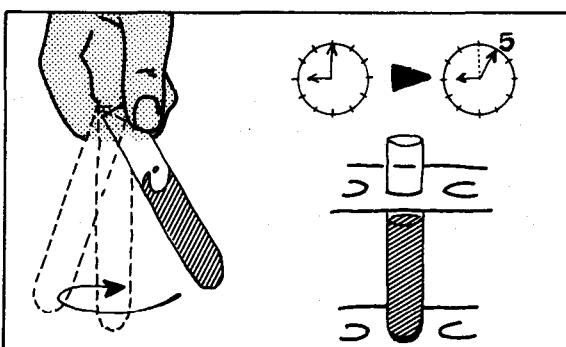


2. Essuyer la pipette extérieurement. Vérifier que le sang atteint toujours le repère.

Souffler le sang mesuré dans le réactif et rincer la pipette en aspirant et en refoulant à 3 reprises le liquide dans le tube.



3. Mélanger le contenu du tube et attendre 5 minutes.



4. Mettre le colorimètre à zéro avec du réactif de Drabkin.

Placer le mélange sang du malade/réactif de Drabkin dans la cuve de lecture et lire la densité optique correspondante.

Si le sang dilué se trouble, cela peut être dû à la présence de protéines anormales du plasma ou à une concentration leucocytaire élevée. Centrifuger le liquide avant de lire le résultat.

Reporter le chiffre obtenu sur la courbe d'étalonnage pour en déduire la teneur en hémoglobine, en g/l.

RÉSULTATS – VALEURS NORMALES

	Hémoglobine (Fe) mmol/l	Hémoglobine g/l
Enfants à la naissance	8,4-12,1	136-196
Enfants de 1 an	7,0- 8,1	113-130
Enfants de 10 à 12 ans	7,1- 9,2	115-148
Femmes	7,1-10,2	115-165
Hommes	8,1-11,2	130-180

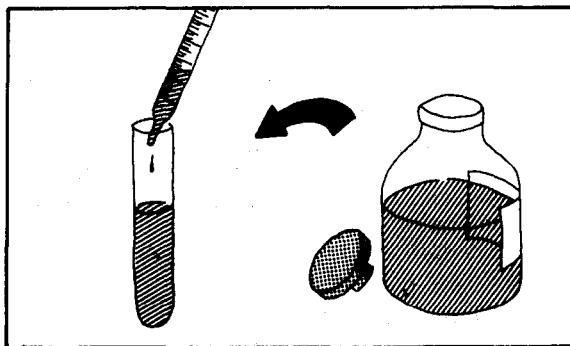
21. Hémoglobine : utilisation d'un comparateur

Principe

C'est une méthode visuelle pour estimer la quantité d'hémoglobine. Il s'agit de comparer la solution à examiner à une série étalonnée de tubes témoins colorés correspondant à différentes quantités d'hémoglobine.

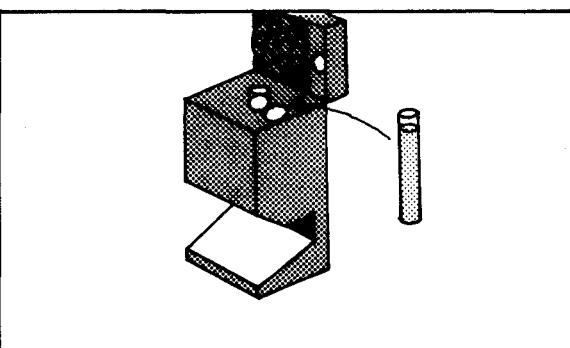
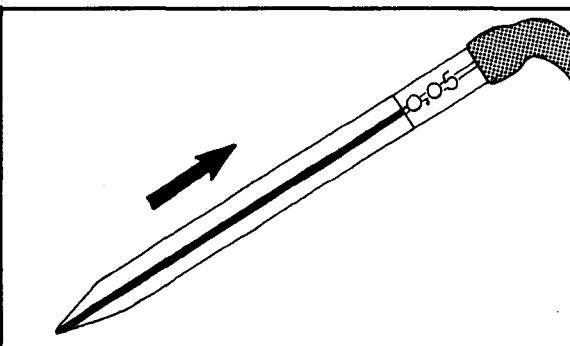
MATÉRIEL

- Comparateur d'hémoglobine avec tubes témoins correspondant à une quantité d'hémoglobine de 3 à 13 g par décilitre (g/dl)
- Deux tubes pour comparateur
- Pipettes de 0,05 ml (50 mm³ ou 50 µl)
- Diluant d'hémoglobine. Il s'obtient en ajoutant 0,4 ml de solution ammoniacée forte à 1 litre d'eau distillée.



MÉTHODE

1. Verser 10 ml de diluant dans un tube à essai.
 2. Aspirer du sang veineux ou capillaire jusqu'à la marque 0,05 ml (50 mm³ ou 50 µl) de la pipette. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. Pour le sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé à l'anticoagulant (voir page 68) en renversant le flacon qui les contient, à plusieurs reprises, pendant 1 minute, immédiatement avant de le prélever à la pipette.
 3. Essuyer extérieurement la pipette, vérifier que le sang atteint toujours la marque et le verser dans les 10 ml de diluant.
 4. Mélanger.
- Le liquide deviendra rouge clair quand les hématies seront hémolysées, couleur qui persistera pendant quelques heures.
5. Remplir de liquide un des tubes du comparateur, jusqu'à la marque. Soulever le couvercle et mettre le tube dans la partie droite du comparateur.



6. Remplir de diluant un autre tube du comparateur, jusqu'à la marque, et le mettre du côté gauche du comparateur. Rabattre le couvercle.



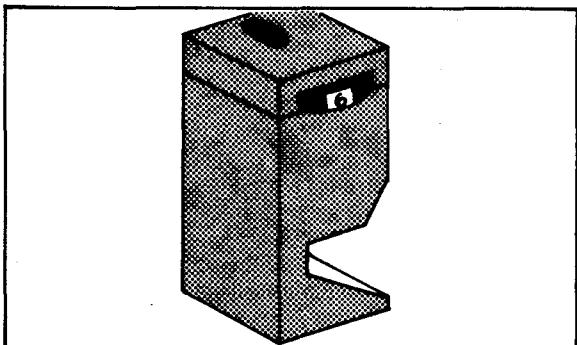
7. En tenant l'appareil face à la lumière du jour, regarder par l'ouverture prévue à cet effet, comme indiqué sur le dessin.

8. Procéder à la lumière du jour, mais sans s'exposer directement aux rayons du soleil.

9. En commençant par les témoins les plus pâles, comparer chacun d'entre eux à la couleur de la solution, telle qu'elle apparaît dans la partie gauche de l'ouverture.

Quand les couleurs sont aussi proches que possible, faire un dernier contrôle en comparant avec les témoins de chaque côté du tube retenu.

10. Lire la quantité d'hémoglobine en grammes par décilitre (g/dl), telle qu'elle apparaît sur le disque utilisé pour faire pivoter les tubes témoins.



11. Si l'on hésite entre deux couleurs, prendre la valeur intermédiaire entre les deux.

Si le sang dilué est plus foncé que l'étalon correspondant à 3,0 g/dl, indiquer que la quantité d'hémoglobine dépasse 3,0 g/dl. Ou faire une dilution supplémentaire en utilisant un volume égal de sang dilué et de diluant (2,5 ml de chaque). Multiplier par 2 le résultat obtenu.

(Multiplier par 10 pour obtenir la teneur en hémoglobine en g/l ou par 0,62 pour obtenir la quantité d'hémoglobine (Fe) en mmol/l.)

22. Hémoglobine : dosage par la méthode de Sahli

Méthode inexacte

La méthode de Sahli ne donne pas un dosage exact de l'hémoglobine. Tous les types d'hémoglobine du sang circulant ne se transforment pas en hématine acide; visuellement, les changements de couleur ne sont pas très sensibles et la couleur brune de la solution témoin n'est pas vraiment semblable à celle de l'hématine acide.

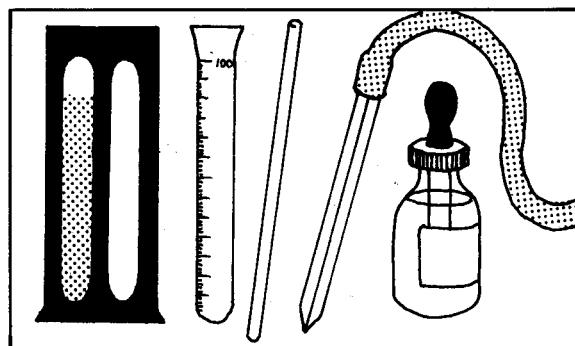
Cette méthode n'est décrite ici que parce qu'elle est encore employée dans certains laboratoires, mais elle est déconseillée.

Principe

Le sang est dilué dans une solution acide, ce qui transforme l'hémoglobine en hématine acide, qui est alors comparée à une solution témoin colorée.

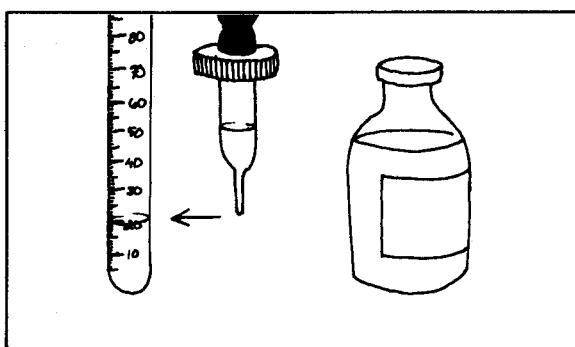
MATÉRIEL

- Hémoglobinomètre de Sahli
- Pipette de Sahli (graduée à 20 mm^3 , soit 0,02 ml ou $20 \mu\text{l}$)
- Petit agitateur de verre
- Pipette compte-gouttes
- Papier absorbant
- 0,1 mol/l (0,1 N) d'acide chlorhydrique (HCl) (réactif No. 4).

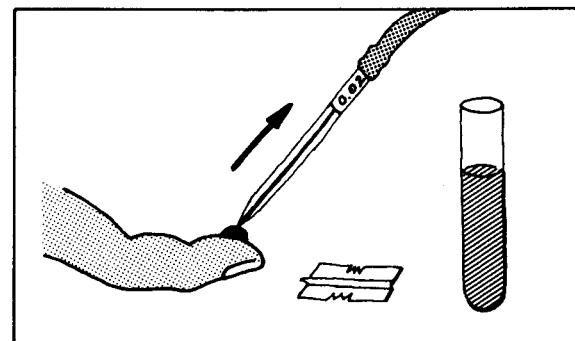


MÉTHODE

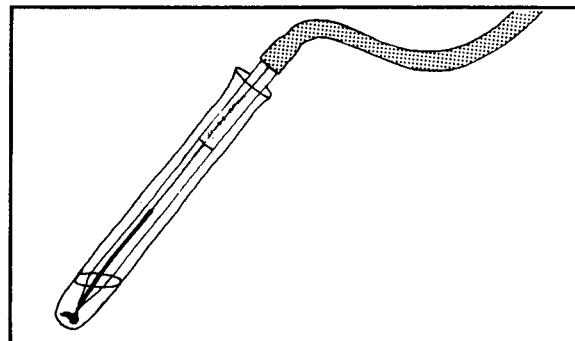
1. Verser 0,1 mol/l de HCl, jusqu'à atteindre la marque 20 (ou la marque 3 g/100 ml) du tube gradué.



2. Aspirer du sang veineux ou capillaire à la pipette de Sahli, jusqu'à la marque 0,02 ml. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. S'il s'agit de sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé à l'anticoagulant (voir page 68) en renversant le flacon qui les contient, à plusieurs reprises, pendant 1 minute, immédiatement avant de le prélever à la pipette. (Ne pas prendre la première goutte de sang perlant sur le doigt.)



3. Essuyer extérieurement la pipette avec du papier absorbant. Vérifier que le sang atteint toujours le repère.



4. Souffler le sang de la pipette dans le tube gradué de solution acide.

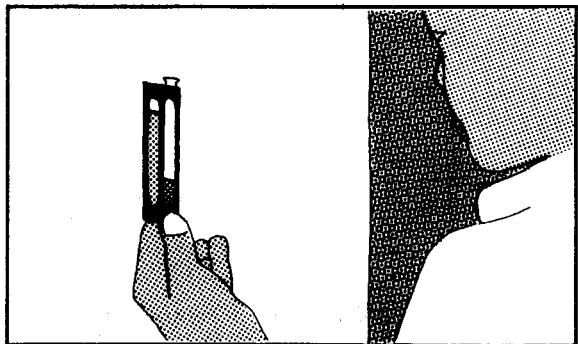
Rincer la pipette en aspirant et en soufflant 3 fois la solution acide.

Le mélange sang et acide prend une coloration brunâtre.

Attendre 5 minutes.

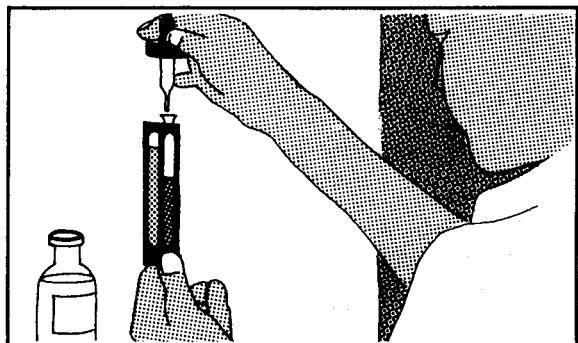
5. Placer le tube gradué dans l'hémoglobinomètre. Se placer face à une fenêtre. Comparer la couleur du tube de sang dilué à celle du tube témoin.

Si la couleur est la même ou si elle est plus claire, la quantité d'hémoglobine est de 40 g/l au plus.



6. Si la couleur est plus foncée, continuer à diluer en ajoutant goutte à goutte 0,1 mol/l d'HCl. Mélanger avec l'agitateur après chaque goutte. Retirer l'agitateur et comparer la couleur des deux tubes.

Arrêter lorsque les 2 tubes ont la même couleur. On peut aussi à ce stade utiliser de l'eau distillée au lieu de HCl pour poursuivre la dilution.



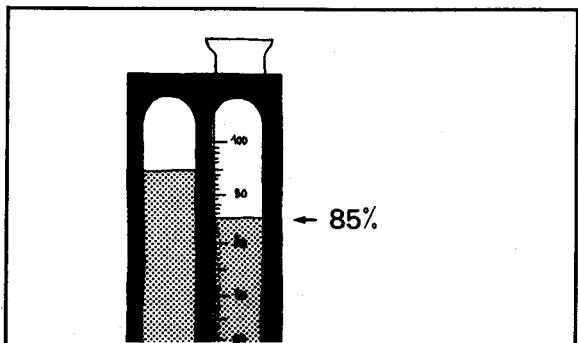
7. Noter la graduation atteinte. Selon le type d'hémoglobinomètre utilisé, on obtient la concentration d'hémoglobine soit en g/100 ml, soit en pourcentage de "la normale" (ce dernier type, voir dessin, n'est pas à conseiller). Pour passer des g/100 ml aux g/l, multiplier par 10. Pour passer des pourcentages aux g/l, multiplier par 1,46.

Exemples:

$$(a) 14,8 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 10 = 148 \text{ g/l}$$

$$(b) 85\% \times 1,46 = 124 \text{ g/l}$$

(La méthode de Sahli est si peu précise qu'on a jugé superflu de donner les facteurs nécessaires pour convertir ces chiffres en mol/l.)



23. Fraction de volume érythrocytaire

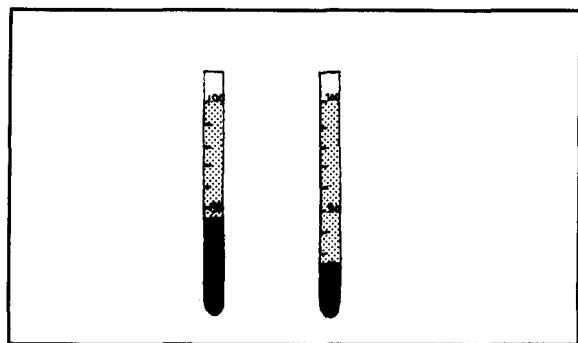
Principe

On appelle fraction de volume érythrocytaire le volume total d'érythrocytes (globules rouges, hématies) présent dans un volume de sang donné, divisé par ce volume de sang. Ainsi, si le volume des hématies dans 1 litre (1000 ml) de sang est de 450 ml, la fraction de volume érythrocytaire est égale à $450 \text{ ml} : 1000 \text{ ml} = 0,45$ (étant donné qu'il s'agit de millilitres divisés par des millilitres l'unité "ml" disparaît et le résultat obtenu est une simple fraction décimale, sans unité). Le reste du sang est composé presque entièrement de plasma, ainsi que d'un petit volume de leucocytes (globules blancs). Si l'on ne tient pas compte de ces derniers, la fraction de volume plasmatique dans l'exemple ci-dessus serait de $550 \text{ ml} : 1000 \text{ ml} = 0,55$ (soulignons que $0,45 + 0,55 = 1,0$, c'est-à-dire que fraction de volume érythrocytaire + fraction de volume de plasma = 1). La fraction de volume érythrocytaire est donc une mesure de la proportion d'hématies par rapport au plasma. Elle est utilisée pour estimer la concentration moyenne de l'hémoglobine érythrocytaire (voir page 386) et aide le médecin à poser un diagnostic au sujet de malades souffrant de déshydratation, d'un choc ou de brûlures.

Avant l'introduction des unités SI, la fraction de volume érythrocytaire s'appelait "hématocrite" ou "volume globulaire" et était exprimée sous forme de pourcentage, et non d'une fraction décimale. Dans le système traditionnel, l'hématocrite aurait été égal à 45% dans l'exemple ci-dessus. Relevons qu'avec les unités SI, la valeur numérique ne change pas, mais est exprimée par une décimale au lieu d'une fraction (0,45 au lieu de 45%).

Echelle "macro"

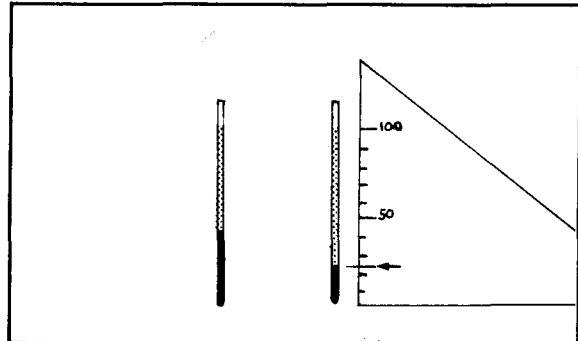
Placer le sang (mélangé à l'anticoagulant) dans un tube gradué et centrifuger pour rassembler toutes les hématies. Lire directement la hauteur de la colonne d'hématies dans le tube gradué.



Echelle "micro"

Placer le sang dans un long tube capillaire et centrifuger sur le plateau d'un centrifugeur pour micro-hématocrite. Lire la hauteur de la colonne d'hématies à l'aide d'un appareil de mesure.

Cette méthode est préférable: elle est plus rapide et permet d'utiliser du sang capillaire prélevé au doigt.



MÉTHODE – ÉCHELLE “MICRO”

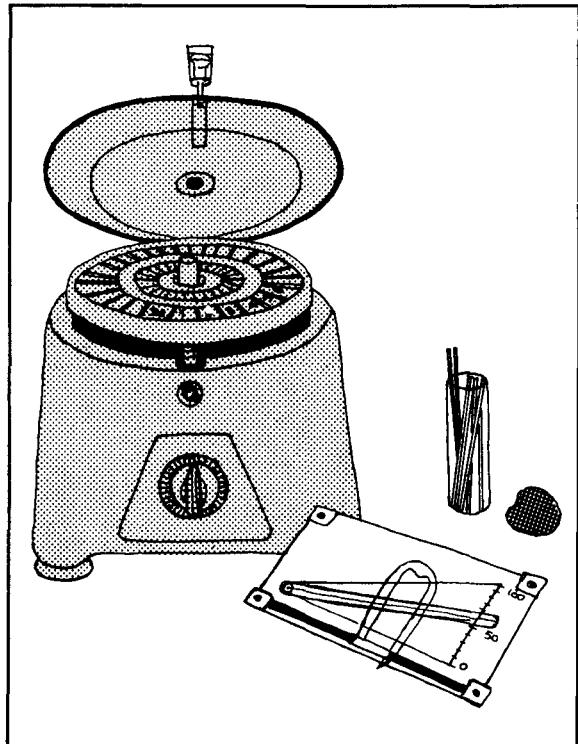
Matériel

- Centrifugeur électrique pour micro-hématocrite avec plateau spécial tournant à grande vitesse
- Echelle spéciale pour lecture du résultat (généralement fournie avec le centrifugeur)
- Tubes capillaires “héparinés”
 - 75 mm de long
 - 1,5 mm de diamètre

(ils contiennent un dépôt d'héparine séchée servant d'anticoagulant).

Si l'on utilise du sang veineux mélangé à du sel dipotassique de l'acide EDTA, les tubes capillaires n'ont pas besoin d'être héparinés, des tubes ordinaires suffisent.

- Cire molle ou pâte à modeler (ou lampe à alcool)
- Vaccinostyle et alcool, pour le prélèvement du sang capillaire.

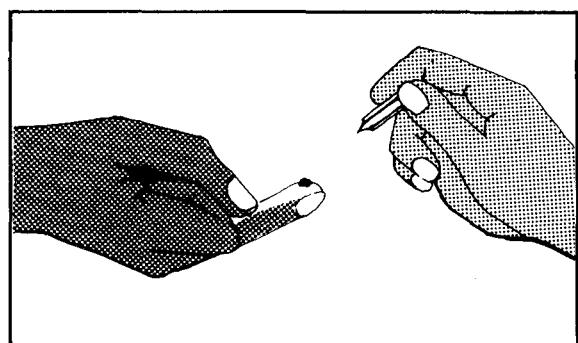


Prélèvement de sang capillaire

Après désinfection à l'alcool prélever à l'aide d'un vaccinostyle:

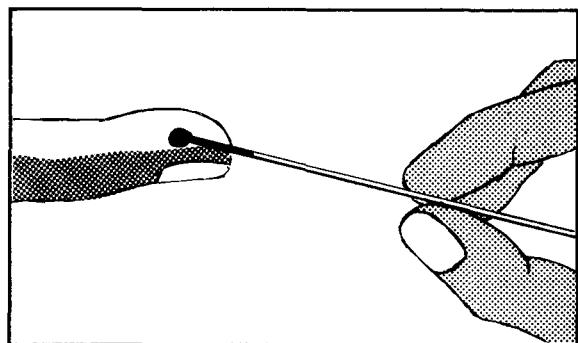
- au 3ème ou au 4ème doigt
- ou au lobule de l'oreille
- ou encore au talon (nourrissons).

Le sang doit s'écouler spontanément ou par une très légère pression. Essuyer la 1ère goutte au papier-filtre.

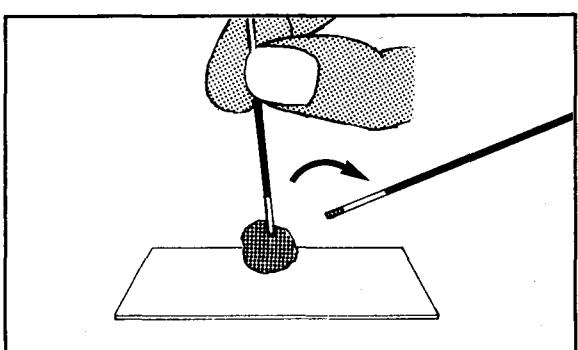


Technique de mesure

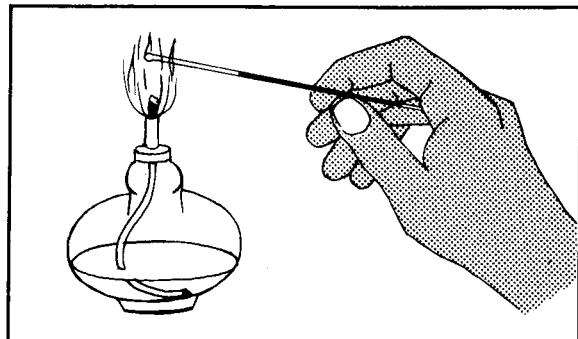
1. Placer l'extrémité (cerclée de rouge) du tube capillaire hépariné dans la goutte de sang.
Le sang pénètre dans le tube par capillarité. Le laisser se remplir environ aux $\frac{3}{4}$.



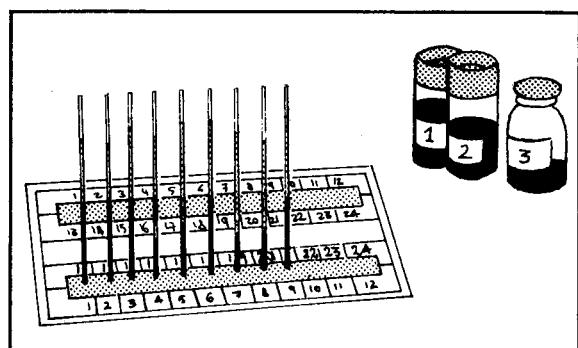
2. Boucher avec la cire molle l'autre extrémité du tube (celle qui n'a pas touché le sang).
Vérifier qu'elle est complètement bouchée sur 2 mm environ.



Si on ne dispose pas de cire molle ou de pâte à modeler, fermer cette extrémité du tube en la chauffant avec prudence au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool.
Laisser refroidir en *position horizontale*.

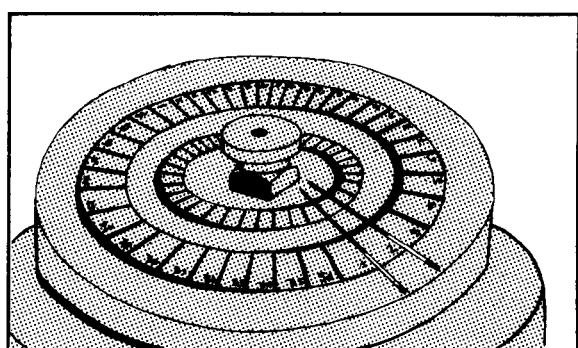


- Il est bon de préparer un portoir à cire molle, pour y planter les tubes de chaque malade en face du numéro d'analyse correspondant.

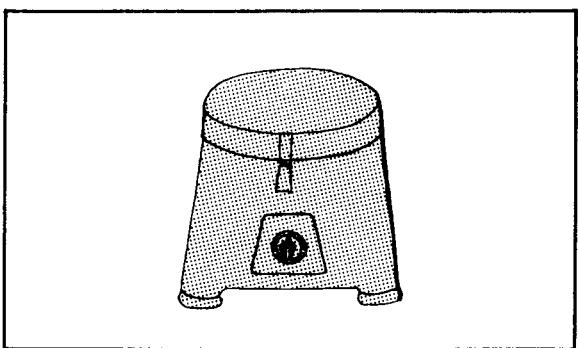


- Déposer les tubes capillaires dans une des rainures numérotées du plateau du centrifugeur, en s'assurant que chaque numéro correspond à celui de l'échantillon.

L'extrémité bouchée à la cire (ou à la flamme) doit être *sur le pourtour extérieur du plateau*.

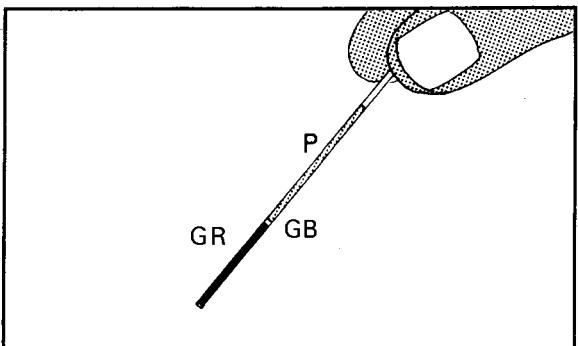


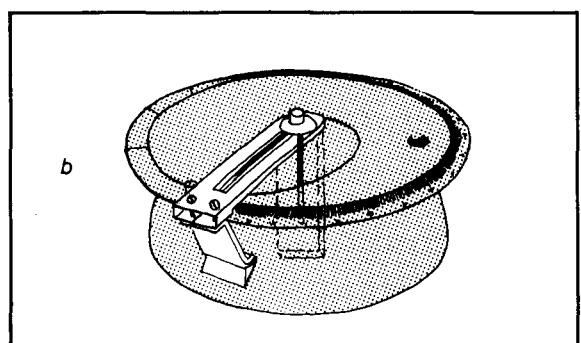
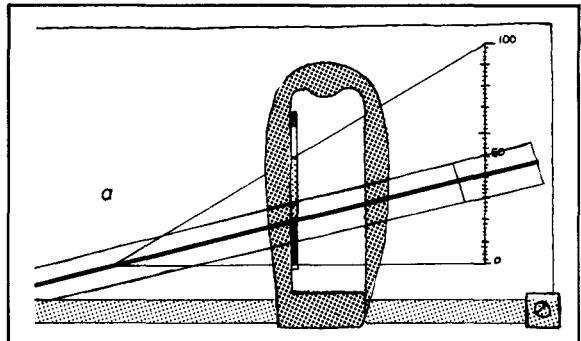
- Centrifuger à grande vitesse.



Après la centrifugation, les tubes contiennent 3 couches:
— *en haut*, une colonne de plasma (P)
— *au milieu*, un très petit disque formé par les globules blancs (GB)
— *au fond*, une colonne de globules rouges (GR).

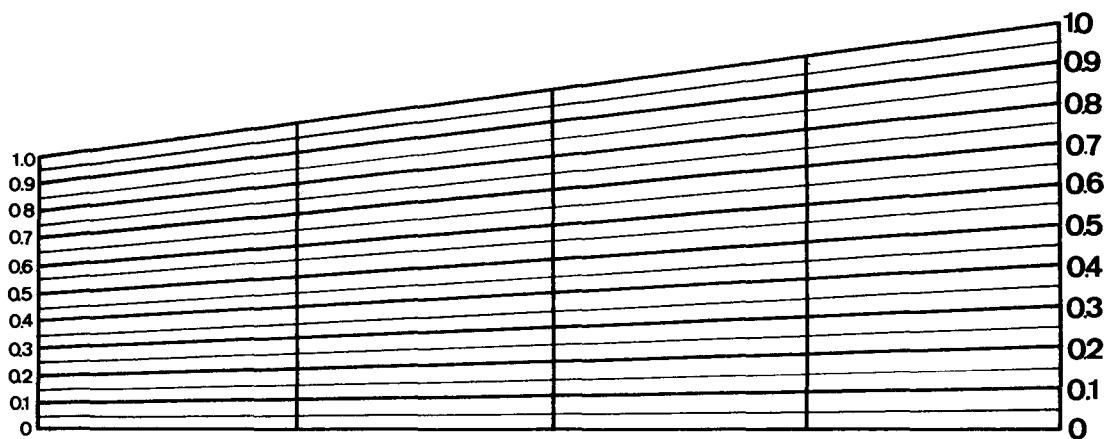
C'est exactement au sommet de cette colonne de globules rouges que se lit la fraction de volume érythrocytaire.





On peut voir ci-contre deux modèles d'appareils de lecture existant sur le marché, (a) un modèle triangulaire et (b) un modèle à spirale.

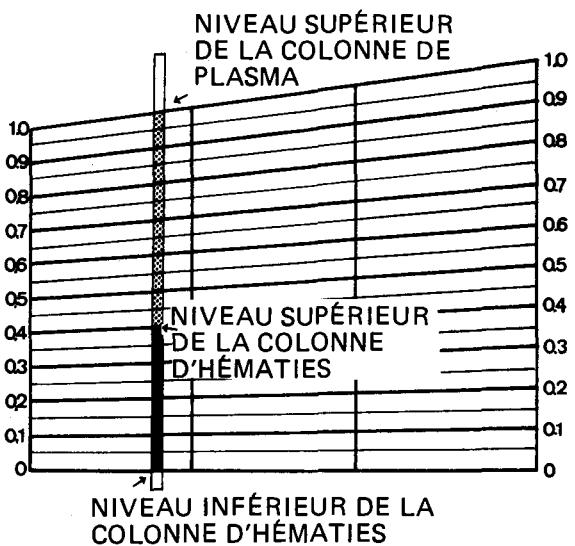
Si on ne possède pas ce type d'appareil, on peut préparer soi-même une table de lecture en utilisant une feuille de papier millimétrique de 15 à 20 cm de large. Le long du bord vertical gauche, à partir du bas, faire une série de 10 marques à des intervalles de 4 mm. Faire de même le long du bord vertical droit, tous les 6 mm. A l'aide d'une règle, relier les points de droite à gauche. Dans la marge de gauche, en face de la première ligne, écrire 0 et continuer à inscrire en face de chaque point et en remontant 0,1, 0,2, 0,3, etc., le dernier point étant marqué 1,0. Ecrire les mêmes chiffres face aux points correspondants le long de la marge de droite. De nouveau à l'aide d'une règle, tracer une deuxième série de lignes obliques beaucoup plus fines que les premières, exactement au milieu de l'espace entre deux lignes épaisses. Enfin, en suivant les lignes du papier millimétrique, tracer une série de lignes verticales bien marquées, tous les 3 cm environ. La table de lecture doit être semblable à celle qui figure ci-dessous. (Au lieu de la reproduire, utiliser éventuellement cette dernière.)



Comment utiliser la table de lecture

1. Tenir le tube devant la table de lecture de façon à ce que le fond de la colonne d'hématies (et *non* le fond du tube) corresponde à la ligne horizontale marquée zéro.
2. Déplacer le tube devant la table de lecture jusqu'à ce que la ligne marquée 0,1 coïncide avec le haut de la colonne de plasma. S'assurer que le niveau inférieur de la colonne d'hématies est toujours à la ligne zéro; s'assurer également (à l'aide des lignes verticales) que le tube est bien droit.
3. La ligne qui coïncide avec le haut de la colonne d'hématies donne la fraction de volume érythrocytaire (0,4 sur le schéma). Les lignes intermédiaires plus fines correspondent à des intervalles de 0,05; si le haut de la colonne d'hématies ne coïncide pas avec une ligne, mais se situe entre un trait épais et une ligne plus fine, on peut en estimer la position au 0,01 le plus proche.

Note: Même si le laboratoire n'a pas encore adopté les unités SI et conserve encore le système traditionnel on peut utiliser la table de lecture. Il suffit de lire les chiffres non comme des fractions mais comme des pourcentages. Ainsi, au lieu de "fraction de volume érythrocytaire 0,4" noter "hématocrite 40%".



Résultats

Chiffres normaux	Fraction de volume érythrocytaire	Système traditionnel: hématocrite
Hommes	0,40-0,50	40-50%
Femmes	0,37-0,43	37-43%
Enfants (5 ans)	0,38-0,44	38-44%
Nourrissons (3 mois)	0,35-0,40	35-40%
Nouveau-nés	0,50-0,58	50-58%

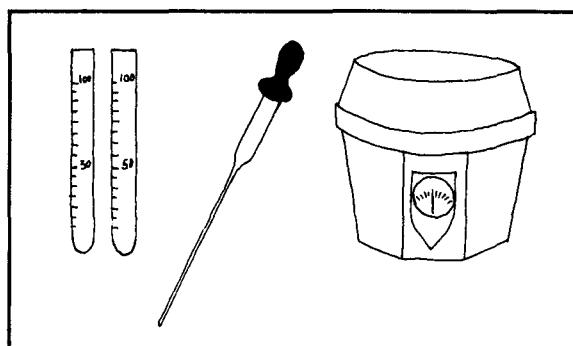
Les chiffres sont faibles chez les sujets atteints d'anémie; la fraction de volume érythrocytaire est alors inférieure à 0,40 chez les hommes et 0,37 chez les femmes (hématocrite 40% et 37% respectivement).

Les chiffres sont élevés en cas de perte de plasma, de brûlures graves, de déshydratation, de diarrhée des nourrissons et de choléra (ainsi que — mais c'est rare — de polycythémie).

MÉTHODE — ÉCHELLE "MACRO"

Matériel

- Centrifugeur électrique ordinaire capable de supporter une force de 2300 g à la base des pots porte-tubes
- Tubes gradués spéciaux (tubes de Wintrobe):
 - diamètre: 0,6 cm
 - longueur: 9,5 cm
 - graduations: 0 à 100
- Pipette Pasteur capillaire fine et longue (pour atteindre le fond du tube) avec tétine en caoutchouc.

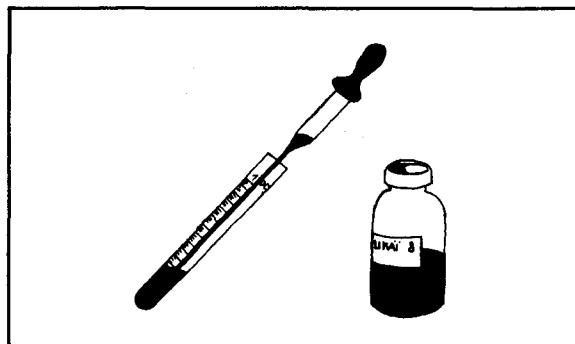


Prélèvement de l'échantillon

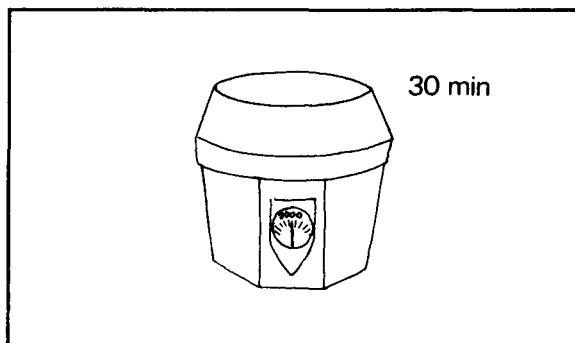
Prélever du sang veineux et l'ajouter à un tube d'anticoagulant (sel dipotassique de l'acide EDTA ou solution de Wintrobe).

Méthode

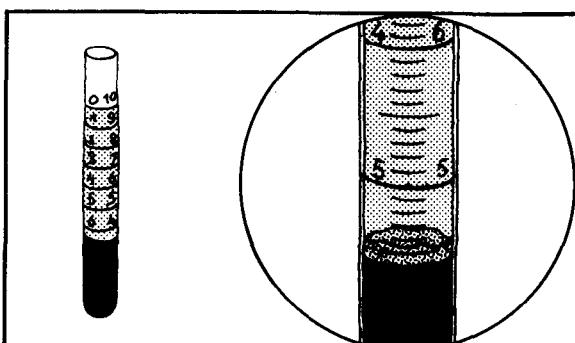
1. Remplir de sang le tube gradué, à l'aide d'une pipette capillaire:
 - jusqu'à la graduation 100
 - en s'assurant qu'il n'entre aucune bulle d'air.



2. Centrifuger pendant 30 minutes à une force centrifuge de 2300 g. Si le bras rotatif du centrifugeur (mesuré à la base du pot porte-tubes) a 15 cm de long, la vitesse devra atteindre 3600 t/min; s'il mesure 20 cm, elle devra être de 3100 t/min.
(Attention: une force inférieure à 2300 g environ aurait pour effet de fausser le résultat.)



3. Lire le résultat à la hauteur de la ligne de démarcation entre la colonne d'hématies et la couche de leucocytes. S'assurer que l'on utilise la bonne série de graduations, vers le haut en direction du 100. Ce chiffre est un pourcentage (le "volume globulaire" ou "hématocrite"); le diviser par 100 pour obtenir la fraction de volume érythrocytaire.



Résultats

Les valeurs normales sont les mêmes que pour la méthode utilisant l'échelle "micro".

RAPPORT ENTRE LA CONCENTRATION ÉRYTHROCYTAIRE ET LA FRACTION DE VOLUME ÉRYTHROCYTAIRE

Normalement, il existe un certain rapport entre la concentration érythrocytaire (nombre d'hématies $\times 10^{12}$ par litre) et la fraction de volume érythrocytaire. Si l'on désigne la première valeur par C , la fraction de volume érythrocytaire se situera normalement dans l'intervalle allant de $(C - 0,2)/10$ à $(C - 0,4)/10$.

Exemple:

Si la concentration érythrocytaire est égale à $5 \times 10^{12}/l$, la fraction de volume érythrocytaire se situera normalement dans l'intervalle allant de $(5 - 0,2)/10$ à $(5 - 0,4)/10$ soit 0,48 à 0,46.

(Dans le système traditionnel, le rapport est le même, mais la formule utilisée pour le calculer est légèrement différente: si C est la numération érythrocytaire, l'hématocrite exprimé en pourcentage se situera normalement dans l'intervalle entre $(C \times 10) - 2$ et $(C \times 10) - 4$.)

RAPPORT ENTRE LA FRACTION DE VOLUME ÉRYTHROCYTAIRE ET LA CONCENTRATION D'HÉMOGLOBINE

La fraction de volume érythrocytaire est normalement égale à 0,003 fois la concentration d'hémoglobine, quand celle-ci est exprimée en grammes par litre. Si elle est exprimée en millimoles d'hémoglobine (Fe) par litre, la fraction de volume érythrocytaire correspond *grossost modo* à 0,05 fois ce chiffre.

Exemple:

Un sujet dont la concentration d'hémoglobine est de 130 g/l aura normalement une fraction de volume érythrocytaire de $130 \times 0,003 = 0,39$. En hémoglobine (Fe), la concentration est de 8,0 mmol/l et la fraction de volume érythrocytaire sera d'environ $8,0 \times 0,005 = 0,4$.

DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES FOURNIES PAR LA DÉTERMINATION DE LA FRACTION DE VOLUME ÉRYTHROCYTAIRE

Leucocytes (globules blancs)

Examiner la couche blanche de leucocytes surmontant la colonne d'hématies. Elle est normalement très mince; si elle paraît épaisse, déterminer la concentration leucocytaire. La couche de leucocytes paraîtra anormalement épaisse si la concentration leucocytaire dépasse $20 \times 10^9/l$ ($20\ 000/\text{mm}^3$). Dans les cas de leucémie, la concentration leucocytaire peut atteindre jusqu'à 100 à $200 \times 10^9/l$ ($100\ 000$ à $200\ 000/\text{mm}^3$) et la couche de leucocytes peut mesurer plusieurs millimètres.

24. Concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire

C'est un chiffre qui exprime la quantité *moyenne* d'hémoglobine que contiennent les hématies. Elle s'exprime soit en grammes d'hémoglobine par litre soit en millimoles d'hémoglobine (Fe) par litre,* et on la calcule en divisant la concentration sanguine d'hémoglobine par la fraction de volume érythrocytaire.

Exemples

(1) Si l'hémoglobine est exprimée en grammes par litre:

$$\begin{aligned}\text{hémoglobine} &= 150 \text{ g/l}; \text{fraction de volume érythrocytaire} = 0,43 \\ \text{concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire} &= 150:0,43 = 349 \text{ g/l}\end{aligned}$$

(2) Si l'hémoglobine est exprimée en millimoles d'hémoglobine (Fe) par litre:

$$\begin{aligned}\text{hémoglobine (Fe)} &= 9,3 \text{ mmol/l}; \text{fraction de volume érythrocytaire} = 0,43 \\ \text{concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire} &= 9,3:0,43 = 21,7 \text{ mmol/l}\end{aligned}$$

(Note: Pour passer des g/l aux mmol/l, multiplier par 0,062 06. Ainsi, dans l'exemple ci-dessus, $349 \text{ g/l} \times 0,062\ 06 = 21,7 \text{ mmol/l.}$)

RÉSULTATS

Normalement, la concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire s'établit entre les limites suivantes: (a) limite inférieure: 322 g/l d'hémoglobine ou 20 mmol/l d'hémoglobine (Fe); (b) limite supérieure: 371 g/l d'hémoglobine ou 23 mmol/l d'hémoglobine (Fe). Quand la concentration s'établit entre ces deux limites, les hématies sont dites "normochromes" (c'est-à-dire de couleur normale). Quand elle tombe au-dessous de la limite inférieure, on parle d'hématies "hypochromes" (c'est-à-dire plus pâles que la normale), comme c'est le cas dans les anémies hypochromes. Si elle dépasse la limite supérieure, il faut d'abord soupçonner une erreur et déterminer à nouveau la concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire. En effet, il n'existe pas vraiment d'hématies "hyperchromes" (plus colorées que la normale), mais les hématies peuvent augmenter de volume et contenir davantage d'hémoglobine; en ce cas, la concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire peut aller jusqu'à 380 g/l (hémoglobine (Fe) 23,6 mmol/l), mais jamais au-delà.

Unités traditionnelles

Dans le système traditionnel, la concentration moyenne d'hémoglobine érythrocytaire s'appelait "concentration globulaire moyenne" (généralement abrégée en C.G.M.) et s'exprimait en pourcentage: on la calculait en divisant par l'hématocrite exprimé en pourcentage la concentration d'hémoglobine du sang, exprimée en grammes par 100 ml, et en multipliant ce chiffre par 100. Exemple: concentration d'hémoglobine, 15,0 g/100 ml; hématocrite, 43%; concentration globulaire moyenne = $(15,0:43) \times 100 = 34\%$. Dans ce système, les valeurs normales vont de 32 à 36% et ne dépassent jamais 38%.

*Voir note sur la façon d'exprimer la concentration d'hémoglobine page 371.

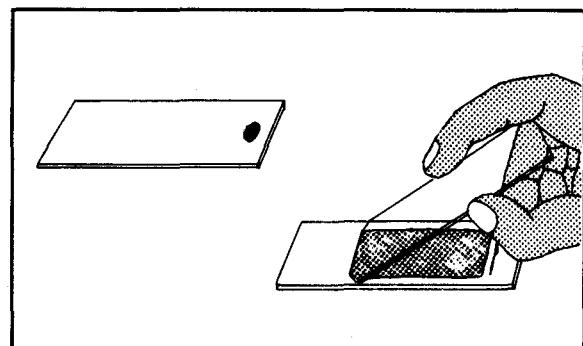
25. Préparation d'un étalement mince

Principe

On étale une goutte de sang sur une lame de verre, de façon uniforme, afin qu'il n'y ait qu'une seule épaisseur de globules.

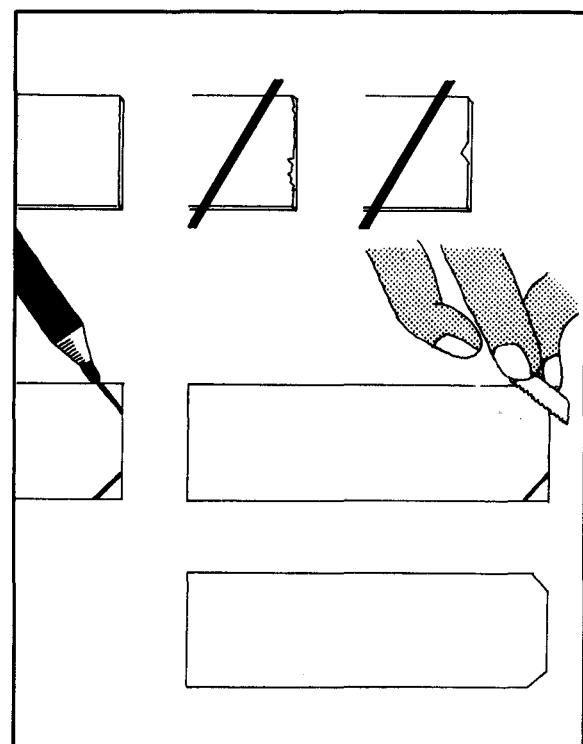
Après coloration, les lames de sang sont utilisées:

- pour l'établissement de la formule leucocytaire
- pour la recherche d'hématies anormales
- pour l'identification de certains parasites.



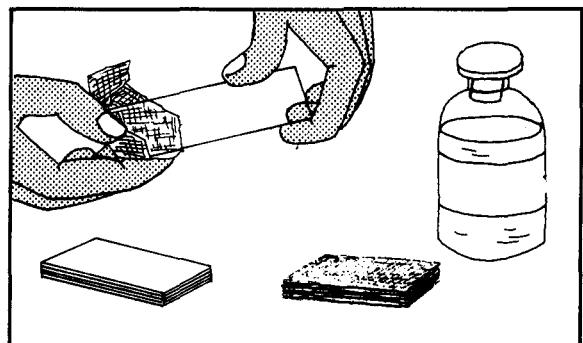
MATÉRIEL

- Lames de verre propres et dégraissées



Préparation d'une lame rodée pour étaler le sang

1. Choisir une lame de verre au bord parfaitement lisse.
2. Avec une lime, limer en oblique 2 coins à une extrémité de la lame.
3. Détacher les 2 coins limés.



PRÉPARATION DES LAMES

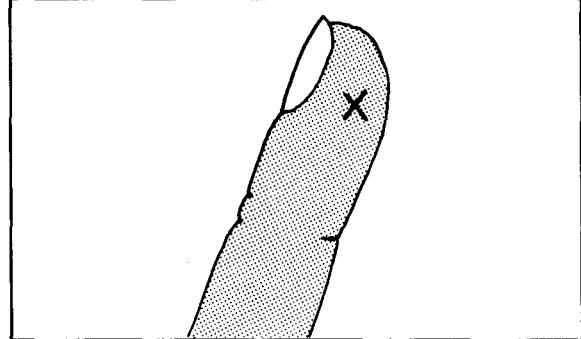
Les lames destinées à recevoir des étalements minces de sang doivent être bien lavées et, le cas échéant, nettoyées à l'aide d'un chiffon doux imbibé d'alcool-éther.

PRÉLÈVEMENT D'UN ÉCHANTILLON DE SANG

Prélever du sang

- du 3ème ou du 4ème doigt
- sur le côté du doigt.

Laisser le sang s'écouler librement. Prélever en premier lieu les échantillons nécessaires pour déterminer les concentrations globulaires (si elles sont demandées).



Attention. Ne pas prélever de sang:

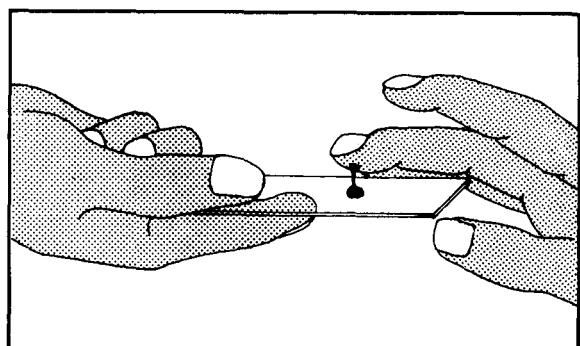
- à l'index ou au pouce
- à un doigt infecté (panaris, etc.)
- à l'oreille (trop de monocytes).

Utilisation d'anticoagulants

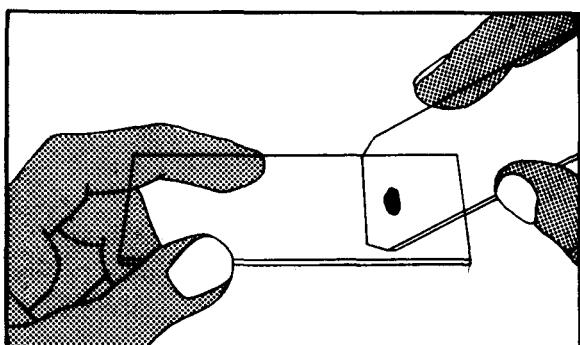
N'employer que de la solution sèche de sel dipotassique de l'acide EDTA; les autres anticoagulants altèrent l'aspect des leucocytes. Mieux vaut ne pas laisser le sang dans un anticoagulant avant de faire un étirement.

TECHNIQUE DE L'ÉTALEMENT

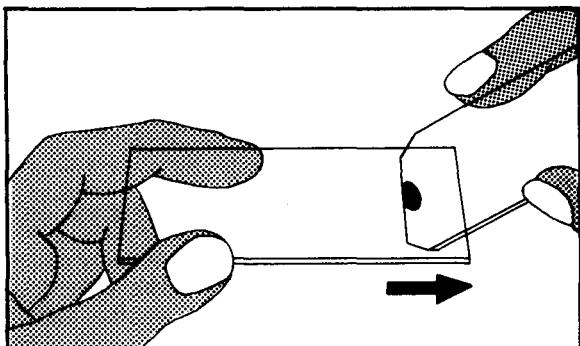
1. Recueillir une goutte de sang de cette grosseur: ● en la mettant délicatement en contact avec une extrémité de la lame.



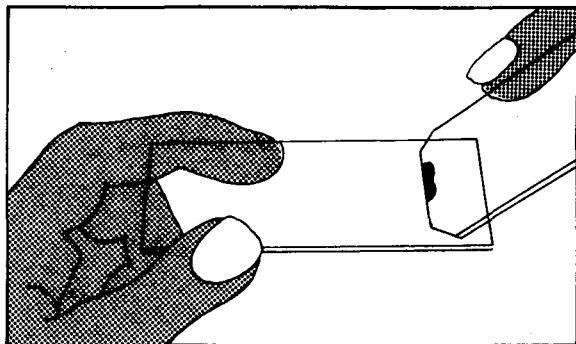
2. Tenir la lame d'une main. De l'autre, poser le bord de la lame rodée juste en avant de la goutte de sang.



3. Faire glisser la lame rodée jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang.

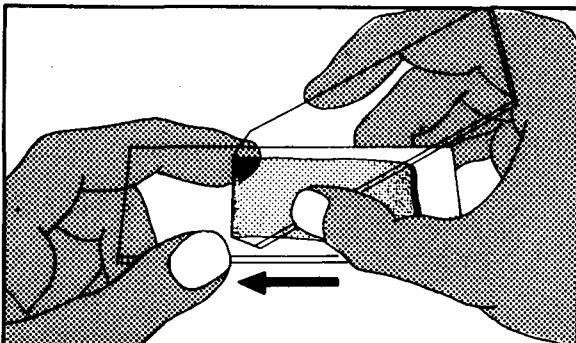


4. Laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée.



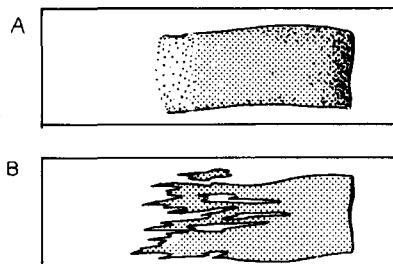
5. Pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier (tout le sang doit être réparti avant que l'on atteigne le bout de la lame).

Le sang de malades atteints d'anémie doit être étalé plus rapidement.



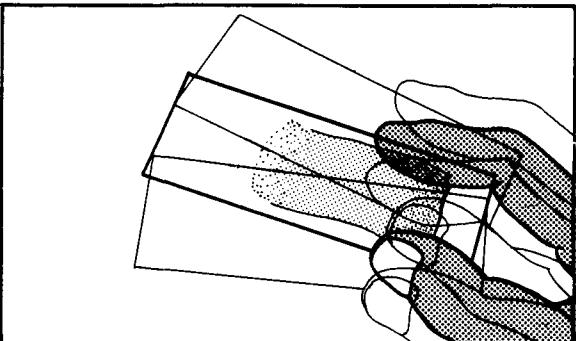
6. Vérifier que l'étalement est bien fait (voir dessin A):
- il ne doit pas présenter de lignes transversales ou horizontales
 - il doit être lisse aux extrémités, et non irrégulier ou strié, comme sur le dessin B
 - il ne doit pas être trop long
 - il ne doit pas être trop épais
 - il doit être étalé uniformément (ce qui n'est pas le cas si l'on utilise une lame graisseuse).

Il est essentiel que l'étalement soit bien fait. Sinon, la formule leucocytaire s'en trouverait faussée et il serait impossible de rendre compte de la morphologie des hématies.



SÉCHAGE

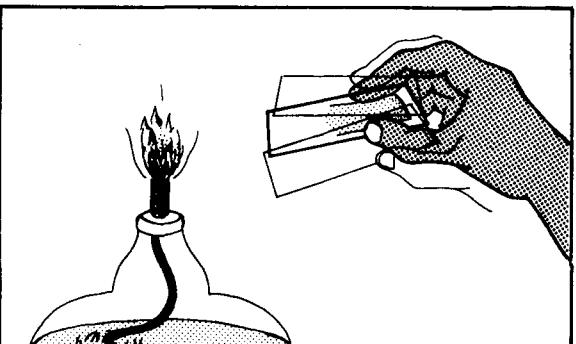
Un séchage correct est capital pour conserver la qualité de l'étalement, surtout dans les pays à *climat humide*.



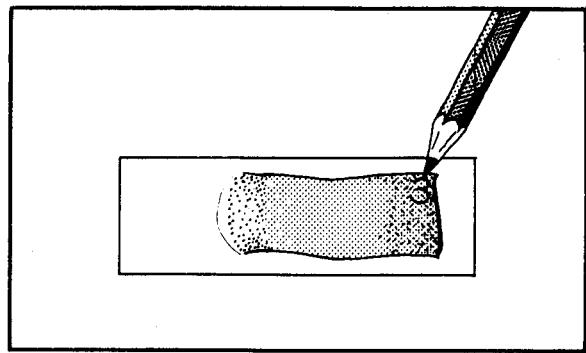
Pendant la saison des pluies (pays tropicaux)

Sécher en agitant rapidement à 5 cm environ d'une lampe à alcool allumée; sur le côté de la lampe, un peu au-dessus de la flamme (mais jamais directement au-dessus).

Le cas échéant, mettre les lames à l'abri des mouches.



Inscrire sur la lame le nom et le numéro du malade.
Ecrire au crayon gras sur la partie épaisse de l'étalement,
qui n'est pas utilisée pour l'examen.



FIXATION

Pour déterminer la formule leucocytaire, fixer les lames au méthanol ou, directement, au May-Grünwald (voir page 393).

Pour la recherche de parasites (coloration de Giemsa ou de Field), fixer au méthanol (voir pages 393 et 395).

CONSERVATION

Fixer les lames au méthanol.
Les emballer individuellement dans du papier blanc (une fois sèches).

26. Coloration des étalements minces

Principe

Les étalements minces de sang sont colorés aux colorants de Romanowsky, qui contiennent du bleu de méthylène et de l'éosine. Les colorants de Romanowsky les plus employés sont:

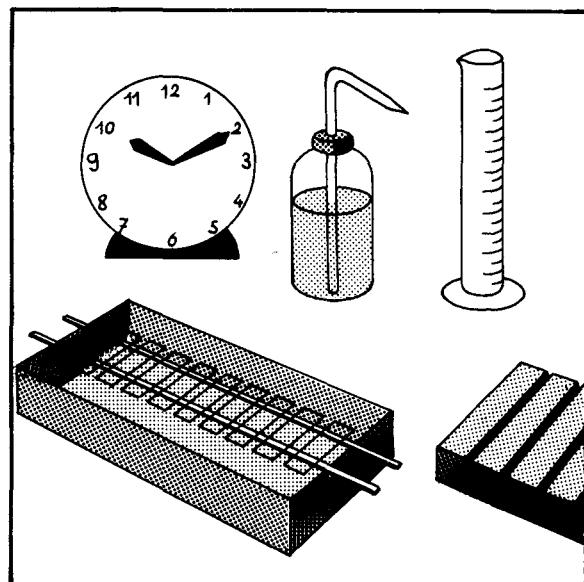
- Leishman et Wright, qui donnent des résultats analogues et sont utilisés seuls
- May-Grünwald et Jenner, qui donnent des résultats analogues et sont utilisés avec le Giemsa
- Giemsa, qui peut être utilisé seul ou avec May-Grünwald ou Jenner
- Field A et B, qui sont préparés dans l'eau, à la différence des produits précipités, pour lesquels on utilise du méthanol. Les colorants de Field sont employés pour préparer aussi bien des gouttes épaisses que des étalements minces.

Les colorants de Romanowsky au méthanol peuvent servir à fixer des étalements minces avant d'être dilués sur les lames pour les colorer. C'est en fixant d'abord au méthanol, puis en effectuant la coloration à l'aide de colorants tout prêts et dilués (voir ci-dessous), que l'on obtient les meilleurs résultats.

COLORATION DE LEISHMAN

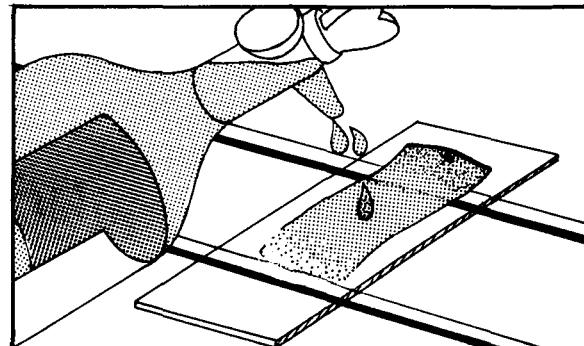
Matériel

- 2 agitateurs en verre placés au-dessus d'un évier ou d'une cuve de coloration
- Eprouvette de 50 ou 100 ml
- Pissette contenant de l'eau tamponnée (réactif No. 20)
- Minuterie
- Râtelier à lames
- Colorant de Leishman (réactif No. 37)
- Méthanol



Méthode

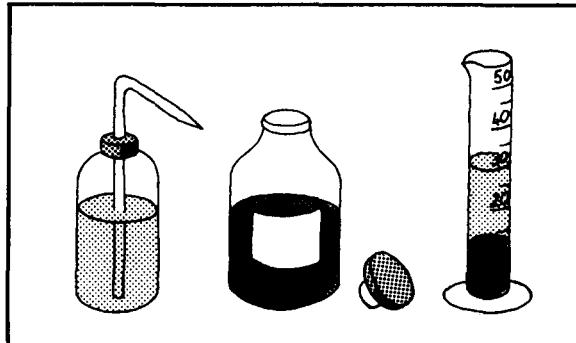
1. Fixer l'étalement mince au méthanol pendant 2 à 3 minutes.



2. Préparer une dilution de Leishman (1:3) en utilisant une part de colorant pour 2 d'eau tamponnée. Mélanger.

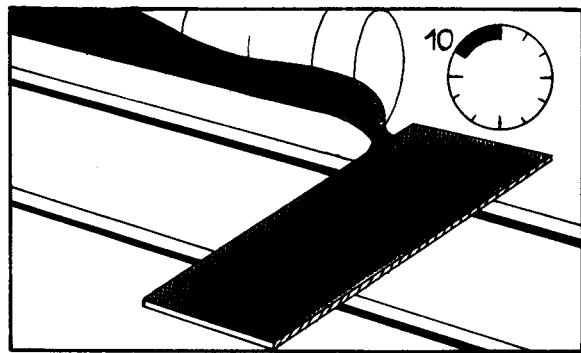
Exemple: Employer 10 ml de colorant pour 20 ml d'eau tamponnée.

Une fois dilué, le colorant se conserve mal; ne préparer que la quantité nécessaire pour une journée.

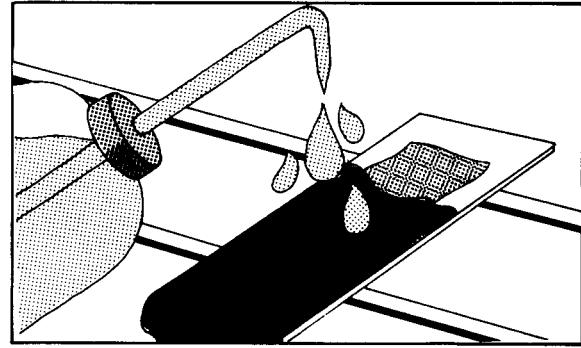


3. Couvrir la lame de colorant dilué et laisser agir 7 à 10 minutes.

Attention: On peut être amené à devoir modifier ce délai, notamment lorsqu'on reçoit un nouvel arrivage de colorant ou si celui-ci a été stocké pendant longtemps.



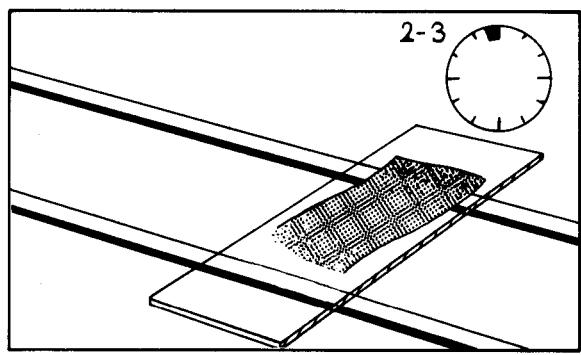
4. Verser de l'eau tamponnée sur la lame pour laver le colorant. Ne pas incliner la lame, car il resterait un dépôt de colorant sur l'étalement.



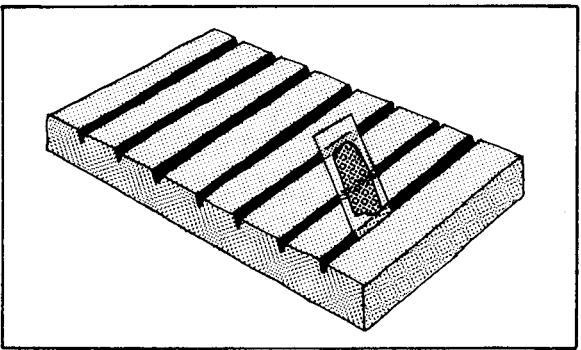
5. Laisser de l'eau propre sur la lame pendant 2 à 3 minutes pour obtenir une coloration différentielle.

Ce délai varie en fonction du colorant utilisé et du pH de l'eau.

Le pH de l'eau a une importance capitale pour différencier les leucocytes avec le colorant de Leishman. Il doit se situer entre 6,8 et 7,2 et, de préférence, entre 7,0 et 7,2 (voir page 61).



6. Laisser égoutter la lame et la placer sur un râtelier pour la faire sécher.



Résultats

Dans un étalement bien coloré:

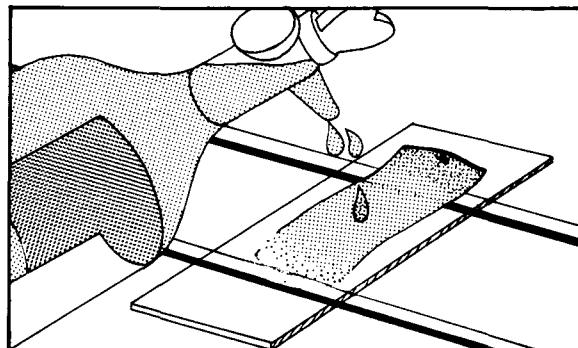
<i>Neutrophiles</i>	Le cytoplasme est coloré en rose pâle et contient de petits granules mauves
<i>Eosinophiles</i>	Le cytoplasme est coloré en rose pâle et contient de gros granules rouges
<i>Monocytes</i>	Le cytoplasme se colore en gris-bleu
<i>Lymphocytes (gross)</i>	Le cytoplasme se colore en bleu clair
<i>(petits)</i>	Le cytoplasme se colore en bleu foncé
<i>Basophiles</i>	De nombreux granules, bleu-mauve foncé, remplissent le globule
<i>Hématies</i>	Se colorent en rouge-rosé
<i>Plaquettes</i>	Se colorent en rose-mauve.

COLORATION DE MAY-GRÜNWALD ET GIEMSA

Matériel

Comme pour la coloration de Leishman.

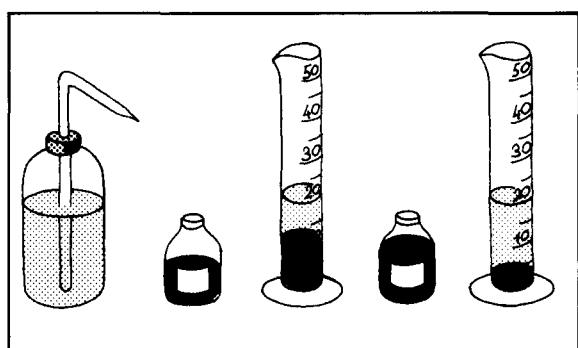
- Colorant de May-Grünwald (réactif No. 39)
- Colorant de Giemsa (réactif No. 31)
- Eau tamponnée (réactif No. 20).



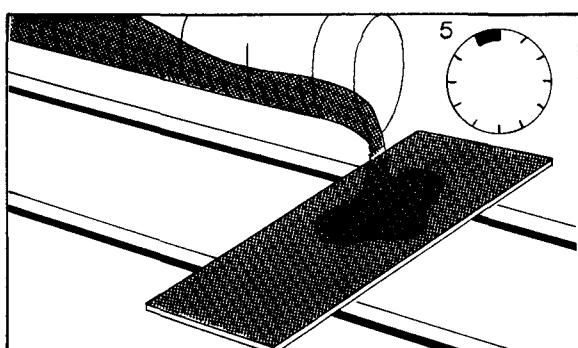
Méthode

1. Fixer l'étalement mince au méthanol pendant 2 à 3 minutes.
2. Pour préparer les colorants, procéder comme suit:
 - diluer du colorant de May-Grünwald (1:2) en mettant un volume égal de colorant et d'eau tamponnée. Mélanger.
Exemple: mettre 10 ml de colorant pour 10 ml d'eau tamponnée.
 - diluer du colorant de Giemsa (1:10) en mettant une part de colorant pour 9 d'eau tamponnée. Mélanger délicatement.
Exemple: mettre 2 ml de colorant pour 18 ml d'eau tamponnée.

Une fois dilués, les colorants ne se conservent pas bien; n'en préparer que la quantité nécessaire pour une journée.

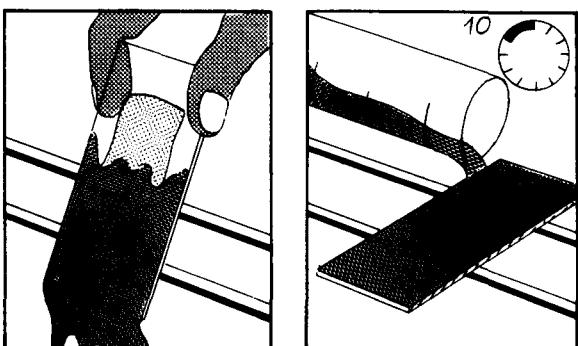


3. Couvrir la lame de colorant de May-Grünwald dilué et laisser agir 5 minutes.

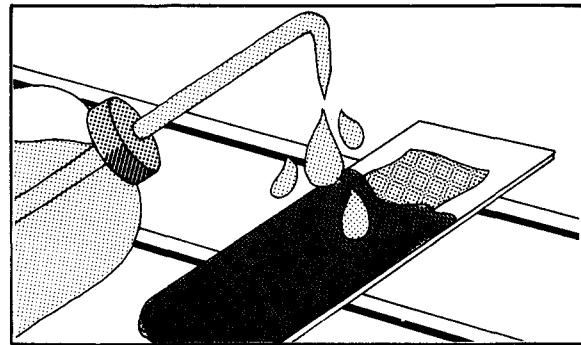


4. Egoutter le colorant et le remplacer par du Giemsa dilué. Laisser agir 10 minutes.

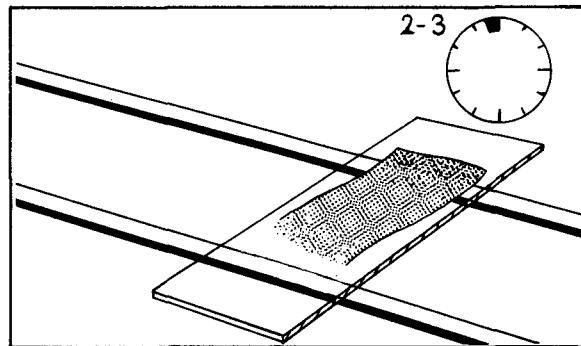
Attention: On peut être amené à modifier ce délai, notamment lorsqu'on reçoit un nouvel arrivage de colorant ou si celui-ci a été stocké longtemps.



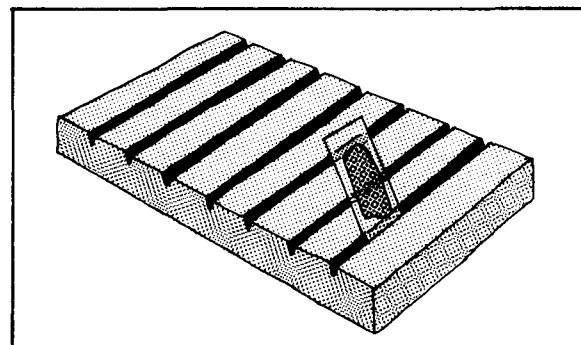
5. Verser de l'eau tamponnée pour laver le colorant.
Ne pas incliner la lame car il resterait un dépôt de colorant sur l'étalement.



6. Laisser de l'eau propre sur la lame pendant 2 à 3 minutes pour obtenir une coloration différentielle.
Cette durée varie en fonction du colorant utilisé et du pH de l'eau, qui doit se situer entre 6,8 et 7,0 (voir page 61).



7. Laisser égoutter l'eau et faire sécher la lame sur un râtelier.

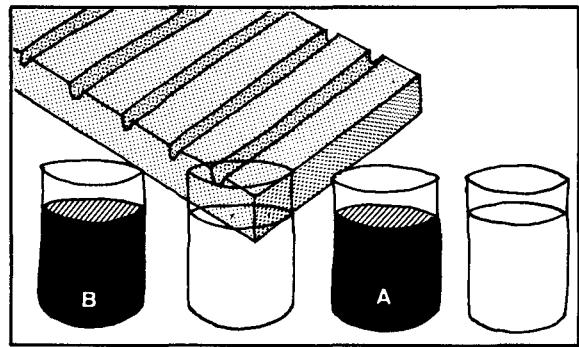


Résultats

Comme pour le colorant de Leishman (voir page 392).

COLORATION RAPIDE DES ÉTALEMENTS MINCES À L'AIDE DES COLORANTS DE FIELD

Avec les colorants de Field, on ne procède pas de la même manière pour les gouttes épaisses et pour les étalements minces. Le colorant B est employé *avant* le colorant A.



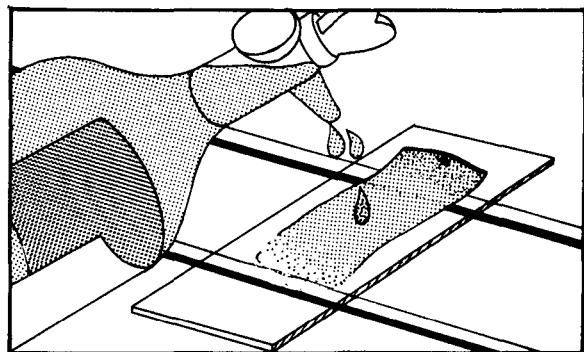
Matériel

- Colorants A et B de Field (réactif No. 25)
- Flacons ou bêchers d'eau propre ordinaire (il n'est pas nécessaire d'employer de l'eau tamponnée).

Les colorants A et B de Field peuvent être utilisés purs aussi longtemps qu'ils donnent de bons résultats. Ils doivent être filtrés tous les 2 ou 3 jours.

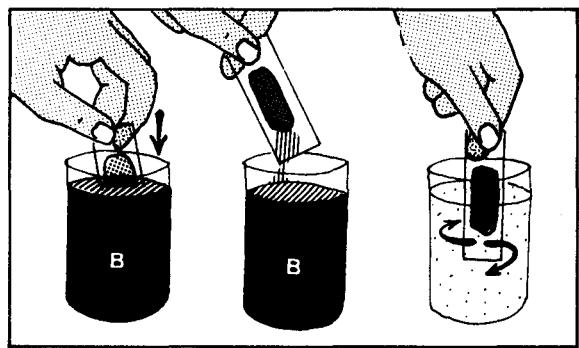
Méthode

1. Fixer l'étalement au méthanol pendant 2 à 3 minutes.



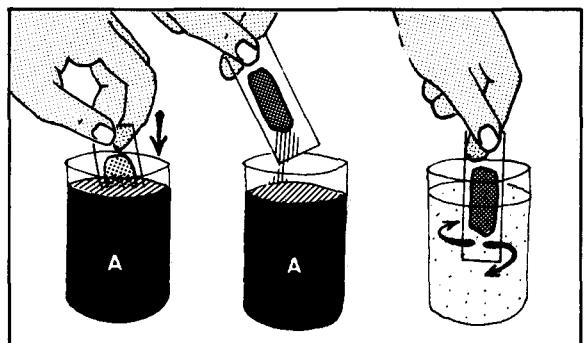
2. Tremper la lame dans le colorant B et compter jusqu'à 5.

L'égoutter et la laver dans le premier récipient d'eau du robinet.



3. Egoutter la lame et la tremper dans le colorant A; compter jusqu'à 10.

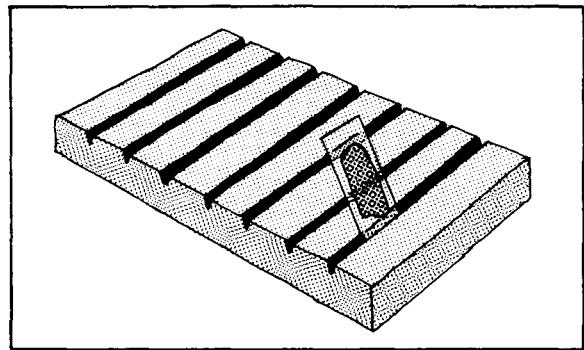
L'égoutter et bien la laver dans le second récipient d'eau.



- Examiner la couleur de l'étalement. Il doit être mauve, ni trop bleu, ni trop rose.

S'il n'est pas satisfaisant, tremper à nouveau la lame selon le cas dans le colorant A ou dans le colorant B, pendant quelques secondes.

S'il est satisfaisant, faire sécher la lame sur un râtelier.



Résultats

Analogues à la coloration de Leishman (voir page 392).

PRÉCAUTIONS A PRENDRE POUR RÉUSSIR LA COLORATION

Eviter la formation de dépôts de colorants, qui ont pour effet de recouvrir la préparation d'une multitude de petites taches noires.

Eviter les mauvaises colorations, trop bleues, trop roses ou trop foncées.

- Verrerie parfaitement propre:* La laver tous les jours. Ne pas utiliser d'acide. Enlever les dépôts de colorant au méthanol.
- Eau neutre* (tamponnée si possible): Voir méthode de préparation page 61. Une eau acide provoque une coloration trop rouge; une eau alcaline une coloration trop bleue. L'eau neutre doit être fraîchement préparée, car, exposée à l'air, elle devient acide.
- Mélange Giemsa:* Le préparer lentement et avec soin. S'ils sont secoués, les colorants sont précipités.

QUE FAIRE SI LA COLORATION N'EST PAS RÉUSSIE

1. Dépôts de colorants

Ils sont dus au colorant de May-Grünwald ou à l'eau neutre et visibles à l'œil nu dans le liquide, sur la lame. Egoutter le colorant. Rincer la lame 2 fois au méthanol. Sécher et refaire la coloration avec un May-Grünwald filtré ou fraîchement préparé.

2. Dépôts de Giemsa

Ils sont visibles à l'œil nu ou au microscope. Rincer également au méthanol, mais laver immédiatement à l'eau neutre. Sécher et recommencer complètement la coloration.

3. Lame trop bleue (basophilie exagérée)

Préparer une solution d'acide borique à 1% dans de l'alcool à 95°. Rincer la lame 2 fois dans cette solution. La laver aussitôt à l'eau neutre. La sécher et l'examiner à nouveau au microscope sans autre traitement. On peut généralement éviter cette basophilie en utilisant de l'eau tamponnée au pH acide et, le cas échéant, en modifiant le temps d'obtention d'une coloration différentielle.

27. Formule leucocytaire et examen des leucocytes

Les leucocytes (globules blancs) du sang ne sont pas tous identiques. Il y a 5 types principaux de leucocytes qui se différencient par la taille, la forme du noyau, la couleur des granulations du cytoplasme et d'autres facteurs. Leur répartition entre les différents types est importante pour le diagnostic. On l'appelle traditionnellement "formule leucocytaire".

Principe

On compte 100 leucocytes et on note le nombre de chaque type. La proportion de chaque type de leucocyte se traduit par une fraction décimale*.

Exemple:

neutrophiles	0,56
lymphocytes	0,25
éosinophiles	0,12
monocytes	0,06
basophiles	0,01

Le total de toutes ces fractions doit être égal à 1.

MATÉRIEL

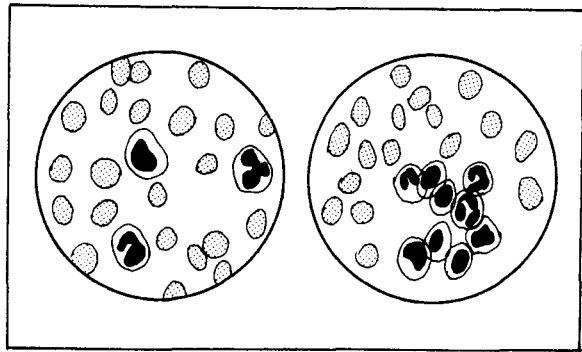
- Microscope (oculaire 5 ou 6 x et objectif 100 x à immersion — on peut aussi utiliser un objectif à sec 40 x, avec lamelettes)
- Huile à immersion
- Étalement mince de sang, bien fait, coloré au colorant de Romanowsky (voir page 393)
- Si possible, compteur spécial à touches, ou compteur à billes fabriqué sur place.

MÉTHODE

Examen de la lame

Utiliser un objectif 100 x à immersion, et s'assurer que les leucocytes sont répartis de façon uniforme.

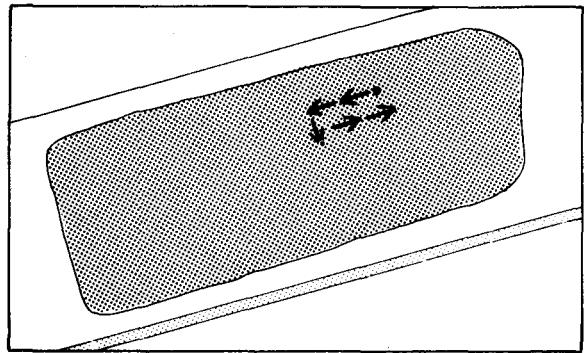
Si l'étalement a été mal fait, les neutrophiles peuvent s'être aggrégés à une extrémité de la lame.



*Dans le système traditionnel, la proportion de chaque type de leucocyte était exprimée en pourcentage — soit, pour l'exemple cité plus haut, 56% de neutrophiles, 25% de lymphocytes, 12% d'éosinophiles, 6% de monocytes et 1% de basophiles.

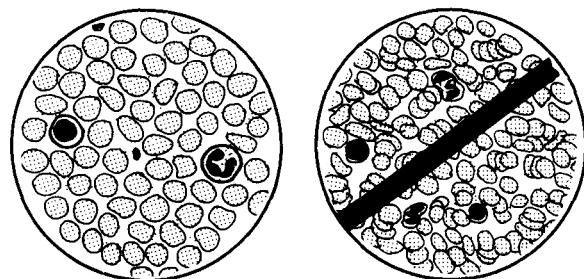
Numération des leucocytes

1. Commencer à compter au bord de l'étalement juste à l'endroit où les hématies commencent à recouvrir les leucocytes.
2. Examiner une bande de la lame, en progressant d'un champ à un autre (voir schéma). Noter le type de leucocyte observé dans chaque champ.
3. Compter au total 100 leucocytes.



S'assurer que l'étalement n'est pas trop épais.

Si l'étalement devient épais (hématies très serrées), cesser la progression vers l'avant et recommencer à compter dans l'autre sens.

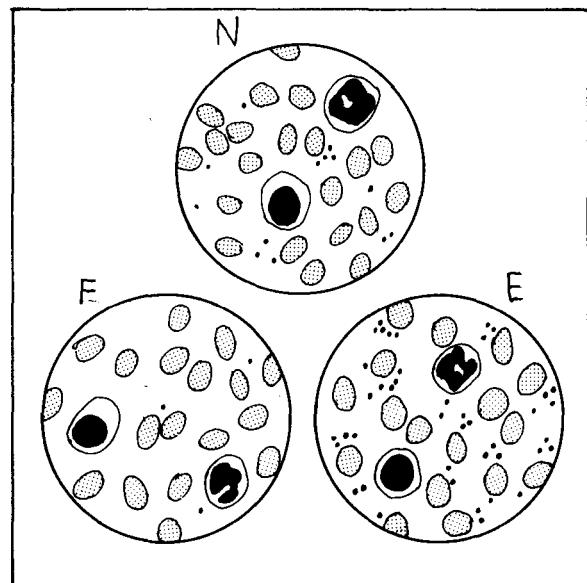


Recherche d'éventuelles anomalies des hématies ou des plaquettes

Examiner les hématies (voir page 407) et noter la présence éventuelle de parasites du paludisme (voir pages 200-201).

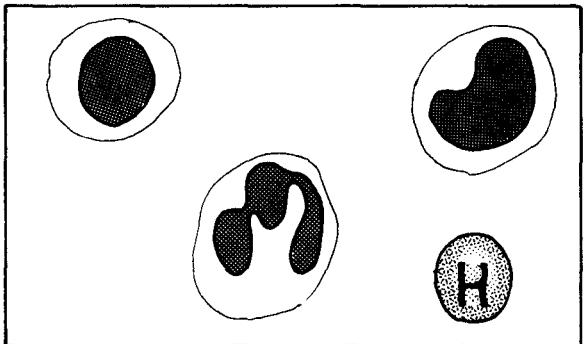
Examiner le nombre de plaquettes en précisant "normal" (N), "faible" (F) ou "élevé" (E).

Si l'étalement est fait à partir de sang capillaire, les plaquettes (voir page 351) se présenteront probablement en amas.

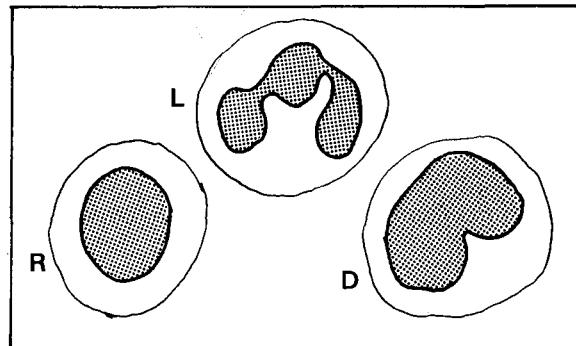


EXAMEN DES LEUCOCYTES

1. Noter la forme des leucocytes et leur taille par rapport à celle d'une hématie (H).



2. Noter la forme du noyau et sa taille par rapport à l'ensemble du leucocyte:
— rond R, lobé L, dentelé D.



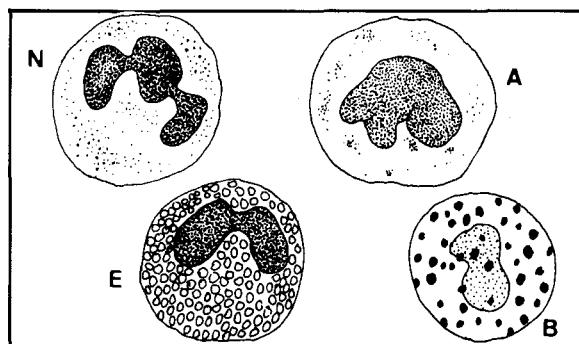
3. Noter l'aspect du cytoplasme.

Couleur:

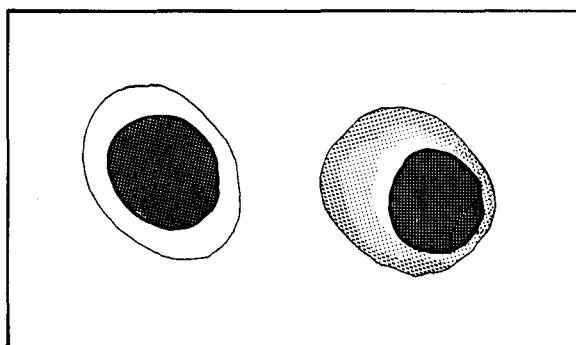
- incolore
- rose
- bleu pâle
- bleu foncé.

Granulations dans le cytoplasme:

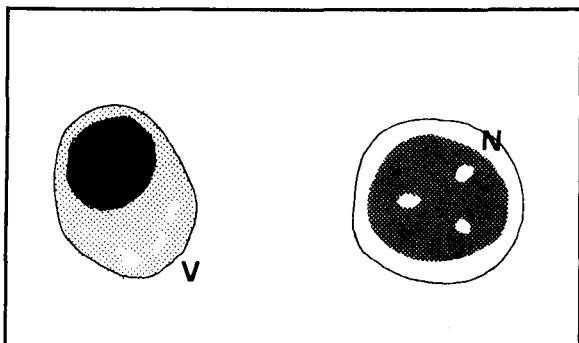
- granulations neutrophiles (N) — petites, mauves
- granulations éosinophiles (E) — grosses, orange à rouge
- granulations azurophiles (A) — assez grosses, rouge-violet vif
- granulations basophiles (B) — très grosses, violet-noir.



4. Noter l'aspect de la chromatine du noyau (coloration dense ou faible), ainsi que la position du noyau dans le leucocyte (centrale ou excentrique).



5. Les vacuoles et les nucléoles sont des plages rondes ou ovales, plus ou moins nettes, qui ne se colorent pas ou très peu.
— vacuoles (V) dans le cytoplasme
— nucléoles (N) dans le noyau.



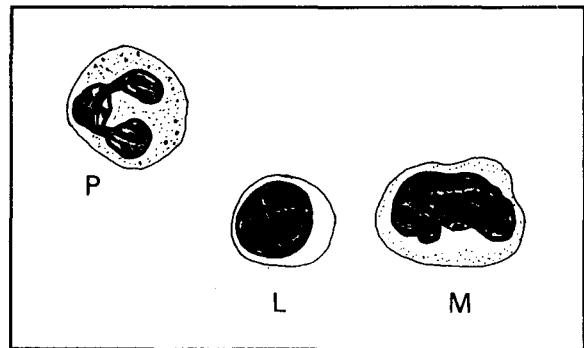
Formes normales

Les polynucléaires neutrophiles (*P*) ont:

- un noyau polylobé
- des granulations cytoplasmiques (d'où leur nom courant de "granulocytes").

Les lymphocytes (*L*) et les monocytes (*M*) ont:

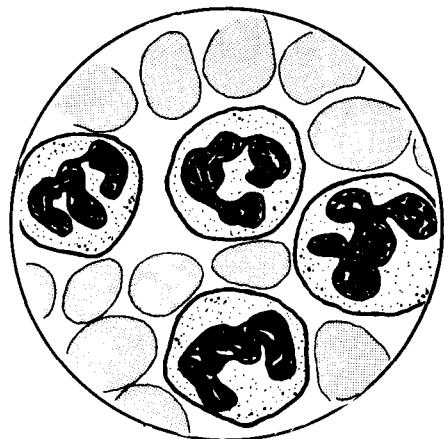
- un noyau compact
- avec ou sans granulations cytoplasmiques.



1a. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE

Taille	12 à 15 µm
Forme	arrondie, bien délimitée
Cytoplasme	abondant, rosé
Granulations	mauvaises et très petites, nombreuses mais distinctes
Noyau	divisé en plusieurs lobes (2 à 5) reliés par des filaments de chromatine. Celle-ci apparaît comme une masse uniforme violet foncé.

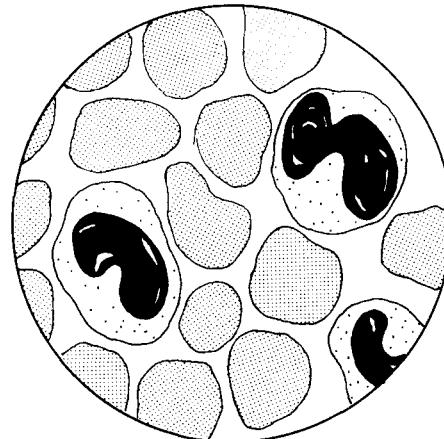
(Plus le polynucléaire est vieux, plus son noyau a de lobes.)

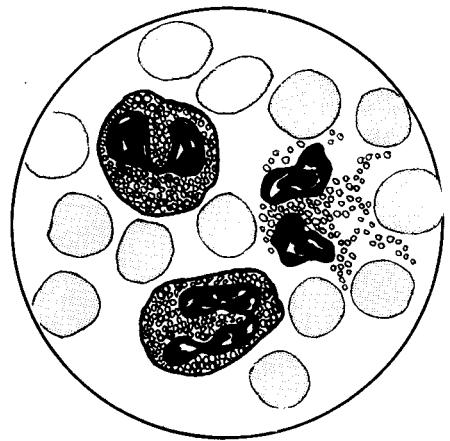


1b. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE UNILOBE (IMMATURE)

Leucocyte semblable au précédent, mais le noyau n'est pas encore divisé en lobes; souvent en forme de S.

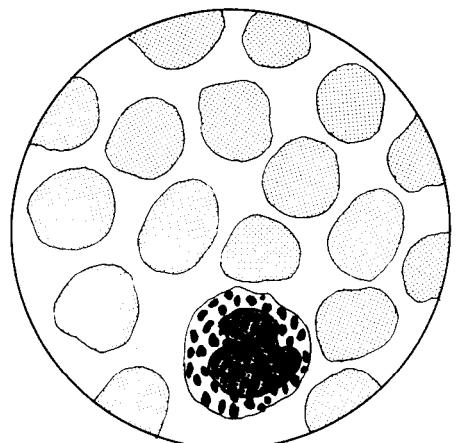
Si l'on observe ce type de leucocyte, en indiquer la fraction de nombre, comme pour les autres types.





2. POLYNUCLÉAIRE ÉOSINOPHILE

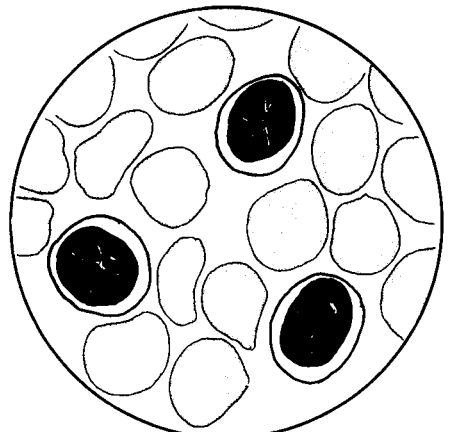
Taille 12 à 15 µm
Granulations grosses, rondes, orangé vif, nombreuses et serrées
Noyau généralement 2 lobes
 Paraît parfois abîmé, avec des granulations dispersées.



3. POLYNUCLÉAIRE BASOPHILE

C'est le type le plus rare de granulocytes.

Taille 11 à 13 µm
Forme ronde
Granulations très grosses, rondes, violet-noir, nombreuses mais moins serrées que les granulations des éosinophiles
Noyau difficile à voir, parce que recouvert de granulations
Vacuoles parfois petites vacuoles incolores dans le cytoplasme.

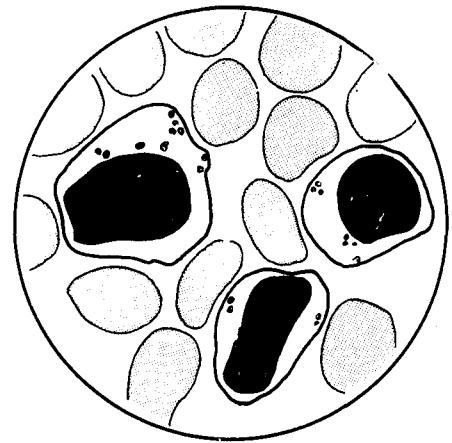


4. PETIT LYMPHOCYTE

Taille 7 à 10 µm
Forme ronde
Noyau volumineux, occupant presque toute la cellule — chromatine dense, violet foncé
Cytoplasme très peu visible; bleu, sans granulations.

5. GRAND LYMPHOCYTE

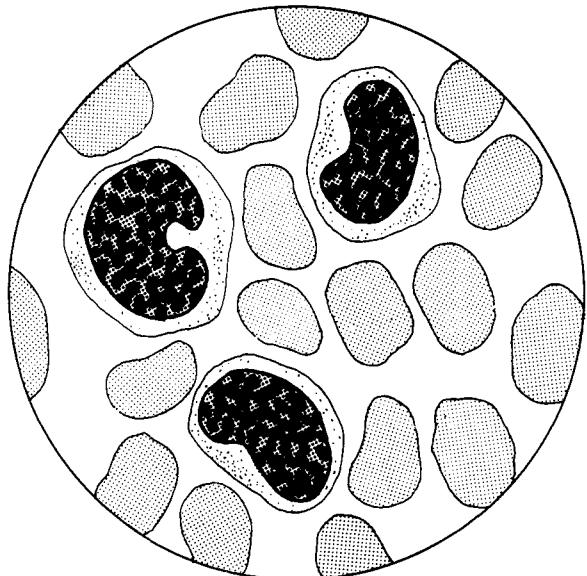
Taille	10 à 15 µm
Forme	ronde ou irrégulière
Noyau	ovale ou rond, peut être placé contre un bord
Cytoplasme	abondant, bleu pâle
Granulations	rares, assez grosses et azurophiles (rouge foncé).



6. MONOCYTE

Taille	15 à 25 µm; c'est le plus grand des leucocytes
Forme	irrégulière
Noyau	d'aspect variable, souvent en forme de haricot, chromatine en filaments, mauve pâle
Granulations	très fines, en poussière, généralement rougeâtres
Vacuoles	généralement quelques vacuoles dans le cytoplasme.

Chez les malades atteints de *paludisme*, le cytoplasme contient souvent des masses brun noirâtre. Il s'agit de pigment paludéen.

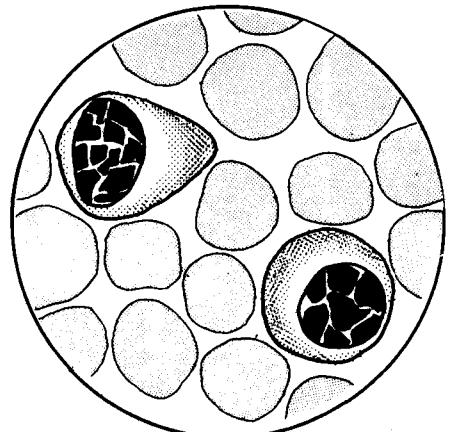


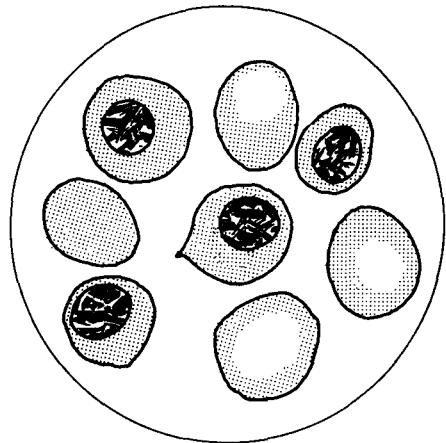
Formes rares ou anormales

7. PLASMOCYTE

Les plasmocytes produisent des anticorps que l'on peut observer sur les lames de sang de sujets atteints de rougeole, de tuberculose, d'autres infections virales et bactériennes, ainsi que dans les myélomes multiples.

Taille	12 à 15 µm
Forme	ronde ou ovale
Noyau	rond, excentrique, chromatine formant des blocs, souvent disposés en rayons de roue
Cytoplasme	bleu sombre, avec un halo clair autour du noyau
Vacuoles	peu visibles, nombreuses et très petites.

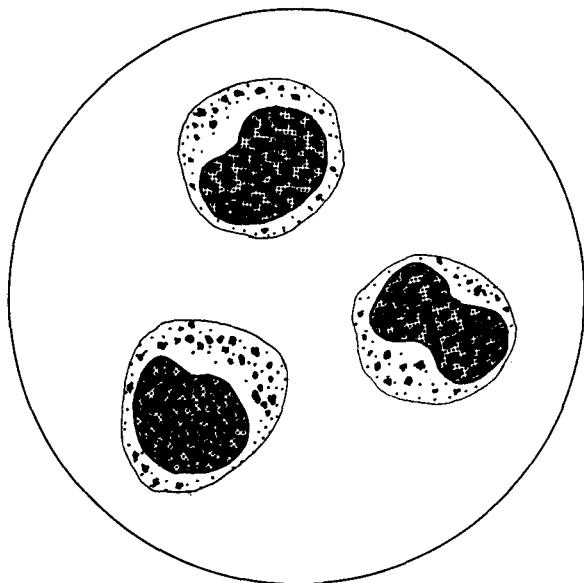




8. HÉMATIE NUCLÉÉE (NORMOBLASTE)

Hématie nucléée immature trouvée normalement dans la moelle des os. Elle passe dans le sang dans certaines maladies (anémies).

Taille	8 à 9 µm
Forme	ronde ou irrégulière
Cytoplasme	rose ou gris-bleu, sans granulations
Noyau	rond, souvent excentrique, chromatine noire, dense, souvent disposée en amas.



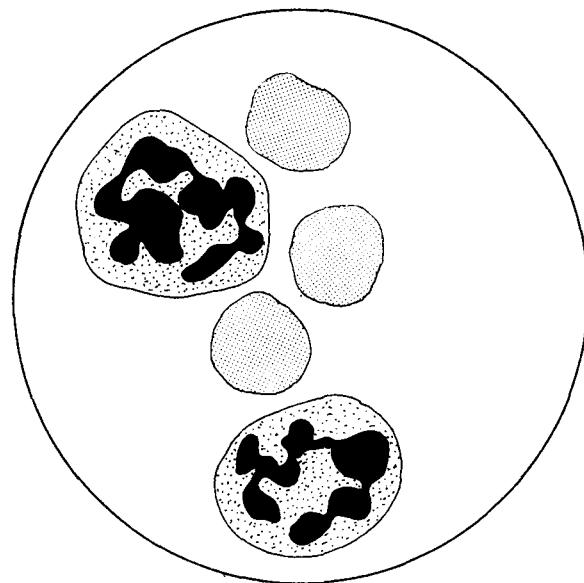
9. GRANULOCYTE IMMATURE

Les granulocytes immatures de la moelle passent dans le sang dans certaines maladies (infections bactériennes graves). Leurs caractéristiques sont les suivantes:

Taille	12 à 18 µm
Noyau	unique, non lobé, chromatine de couleur variable, allant du rouge sombre au violet
Cytoplasme	rose ou bleu pâle
Granulations	nombreuses, grosses, de couleur mauve ou rouge foncé.

On peut observer des granulations toxiques dont les granules sont très gros et de couleur sombre.

Il existe aussi des cellules immatures sans granulations et avec nucléoles: voir No. 12 ci-après.



10. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE HYPER-SEGMENTÉ

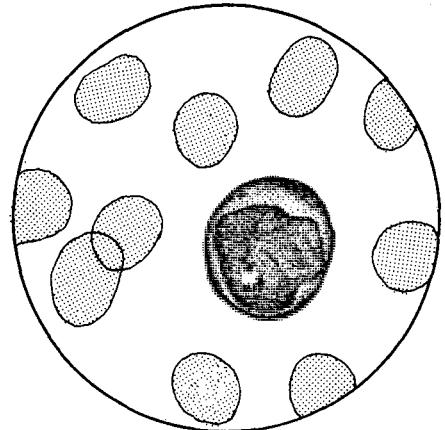
C'est un "vieux" polynucléaire neutrophile dont l'aspect est identique à celui d'un globule normal mais dont le noyau, souvent gros, a de 5 à 10 lobes.

On peut l'observer chez des malades atteints d'anémie macrocytique provoquée par une carence en acide folique ou en vitamine B-12.

11. LYMPHOCYTE ATYPIQUE

Observé dans les infections virales, notamment les mononucléoses infectieuses, la coqueluche et la rougeole, ainsi que dans la tuberculose et les accès graves de paludisme.

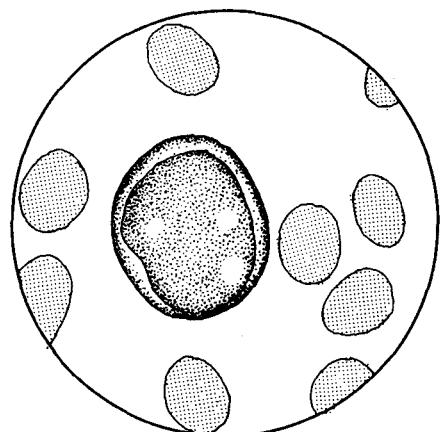
Taille	très variable, 12 à 18 μm
Forme	généralement irrégulière
Noyau	rond ou irrégulier, souvent excentrique; peut comporter des nucléoles
Cytoplasme	généralement bleu plus foncé que celui du grand lymphocyte; bords du globule plus sombres.



12. CELLULE BLASTIQUE, "BLASTE"

Elément le plus jeune (le plus immature) de la lignée des leucocytes. Observé dans les lames de sang de malades atteints de leucémie.

Taille	grandes cellules, 15 à 25 μm
Noyau	volumineux, rond, mauve pâle, contenant toujours 1 à 5 nucléoles
Cytoplasme	bleu foncé, avec une zone plus pâle autour du noyau.

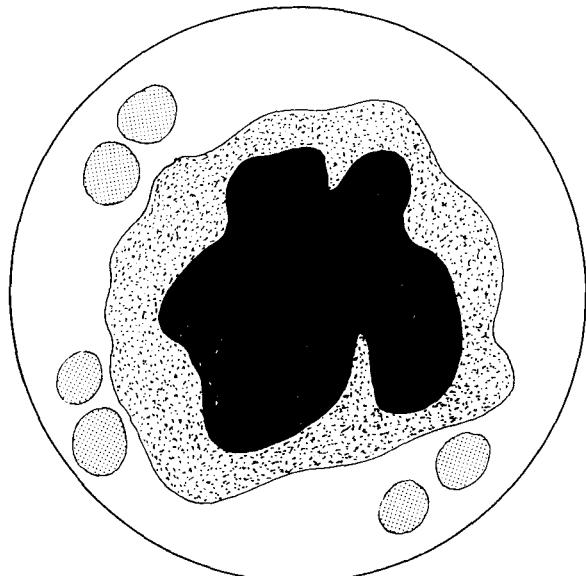


13. MÉGACYCROCYTE

C'est la cellule-mère des plaquettes trouvée dans la moelle osseuse.

Taille	énorme, 60 à 200 μm
Noyau	très irrégulier, polylobé mais massif
Cytoplasme	rempli de fines granulations plutôt azurophiles et de plaquettes Membrane peu distincte.

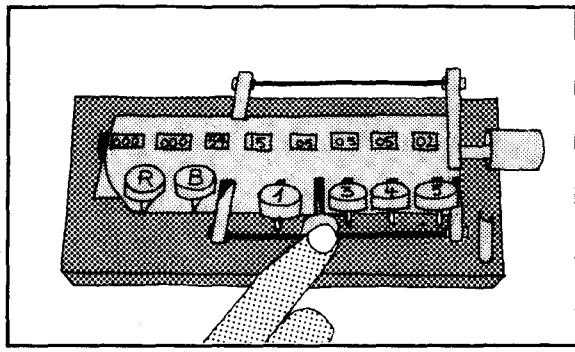
(Très rarement trouvé dans le sang.)



MÉTHODES DE NUMÉRATION

Avec un compteur spécial à touches

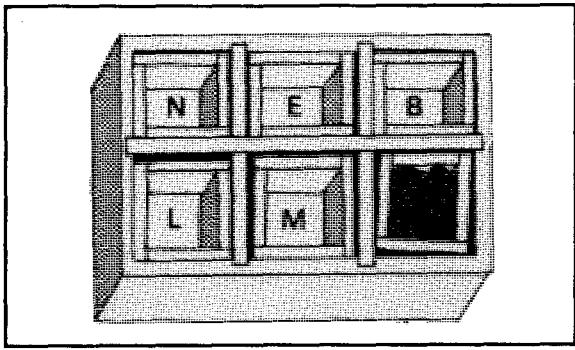
Ces compteurs sont munis d'un clavier dont chaque touche correspond à un type de leucocyte dont ils enregistrent automatiquement le nombre. Ces appareils sont coûteux.



Avec un compteur à billes

On peut le fabriquer sur place, selon le modèle dessiné ci-contre. Il comprend:

- 5 boîtes marquées comme suit:
N = neutrophiles
E = éosinophiles
B = basophiles
L = lymphocytes
M = monocytes.
- une 6ème boîte contient 100 billes (ou haricots, ou grains de maïs) qui serviront à compter.



A l'aide d'un crayon et d'un papier

Inscrire les différents types de leucocytes au fur et à mesure qu'on les compte; procéder comme suit:

Faire un tableau comportant:

- (a) 5 colonnes (N, E, B, L, M) et
- (b) 10 bandes horizontales (modèle ci-contre).

Dès qu'on a tracé 10 traits dans une bande horizontale, passer à la suivante. De cette manière, quand la bande (10) est achevée, on est assuré d'avoir compté 100 éléments exactement.

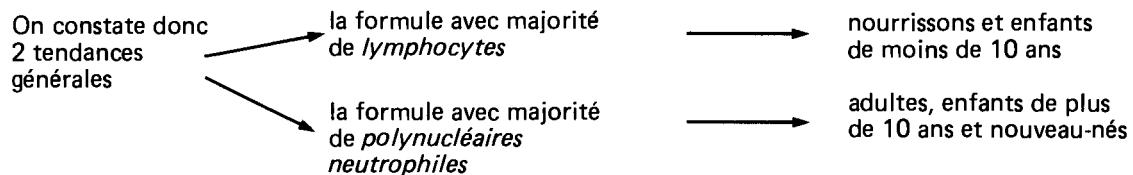
Faire alors le total pour chaque colonne; il donne directement le pourcentage pour chaque type d'élément.

Ces totaux donnent le pourcentage de chaque type de leucocyte. On les transformera en fractions décimales en plaçant la virgule à gauche de 2 chiffres (en ajoutant dans certains cas un zéro). Ainsi 59 = 0,59, 8 = 0,08, 1 = 0,01, 28 = 0,28, etc., comme à la dernière bande horizontale du schéma. Ces décimales sont les fractions de nombre de chaque type de leucocyte et constituent les résultats à indiquer si l'on utilise les unités SI.

	N	E	B	L	M
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
Total	59	8	1	28	4
Frac.	0.59	0.08	0.01	0.28	0.04

RÉSULTATS

	Résultats normaux par groupe d'âge*				
	Nouveau-nés	Après 4 jours	1 à 4 ans	10 ans	Adultes
Polynucléaires neutrophiles	0,55–0,65	0,40–0,48	0,36–0,48	0,45–0,55	0,55–0,65
Polynucléaires éosinophiles	0,02–0,04	0,02–0,05	0,02–0,05	0,02–0,05	0,02–0,04
Polynucléaires basophiles	0 –0,01	0 –0,01	0 –0,01	0 –0,01	0 –0,01
Lymphocytes	0,30–0,35	0,40–0,48	0,44–0,54	0,38–0,45	0,25–0,35
Monocytes	0,03–0,06	0,05–0,10	0,03–0,06	0,03–0,06	0,03–0,06



La proportion de chaque type de leucocyte peut être exprimée sous forme de concentration de nombre (c'est-à-dire de nombre de globules par litre) au lieu de l'être par une fraction de nombre. La concentration de nombre est calculée en multipliant la fraction de nombre de tel type de leucocyte par la concentration de nombre totale de leucocytes. Exemple: **

$$\begin{aligned} \text{Leucocytes: concentration de nombre} &= 5 \times 10^9 / \text{l} \\ \text{Neutrophiles: fraction de nombre} &= 0,42 \\ \text{Neutrophiles: concentration de nombre} &= 0,42 \times 5 \times 10^9 = 2,1 \times 10^9 / \text{l} \end{aligned}$$

Résultats anormaux

- NEUTROPHILIE:** proportion accrue de neutrophiles (plus de 0,65). Dans les infections aiguës notamment.
- ÉOSINOPHILIE:** proportion accrue d'éosinophiles (plus de 0,05). Permet presque toujours de soupçonner une infection parasitaire localisée dans les tissus: schistosomiase, filariose, ankylostomiasis, ascariose, etc. Peut aussi provenir d'une allergie.
- LYMPHOCYTOSE:** proportion accrue de lymphocytes (plus de 0,35). Certaines infections virales (rougeole, etc.), certaines infections chroniques (paludisme, tuberculose, etc.), et certaines conditions toxiques.
- MONOCYTOSE:** proportion accrue de monocytes (plus de 0,06). Certaines affections bactériennes et parasitaires telles que typhoïde, paludisme ou kala-azar.
- NEUTROPÉNIE:** nombre insuffisant de neutrophiles. Peut se produire dans certaines infections ou maladies.

*Valeurs données en unités SI – c'est-à-dire en fractions de nombre. Pour revenir aux unités traditionnelles (pourcentages) multiplier chaque valeur par 100.

**Dans les unités traditionnelles, le calcul est fait en multipliant le pourcentage de neutrophiles par la numération leucocytaire totale et en divisant par 100. Exemple:

$$\begin{aligned} \text{Numération leucocytaire totale} &= 5000 / \text{mm}^3 \\ \text{Pourcentage de neutrophiles} &= 42\% \\ \text{Nombre de neutrophiles par mm}^3 &= (42 \times 5000) : 100 = 2100 / \text{mm}^3 \end{aligned}$$

28. Hématies anormales : examen microscopique

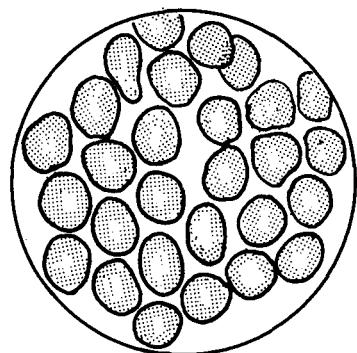
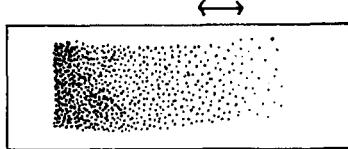
Dans certaines maladies, notamment les anémies, les hématies peuvent présenter:

- une forme anormale
- une taille anormale
- une coloration anormale.

RECHERCHE MICROSCOPIQUE

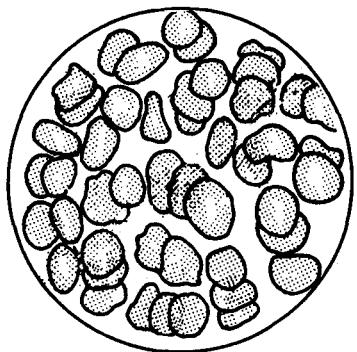
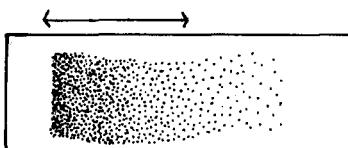
Où examiner les hématies?

Un peu avant la fin de l'étalement, là où elles sont bien séparées et étalées les unes contre les autres, mais sans se chevaucher.



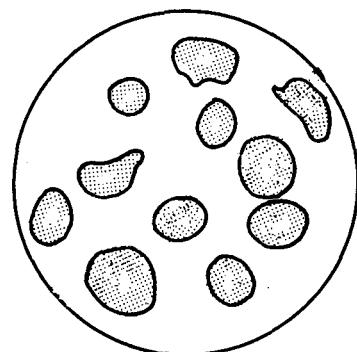
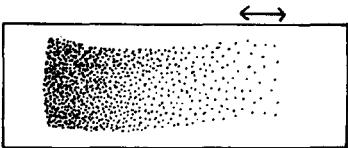
Mauvais

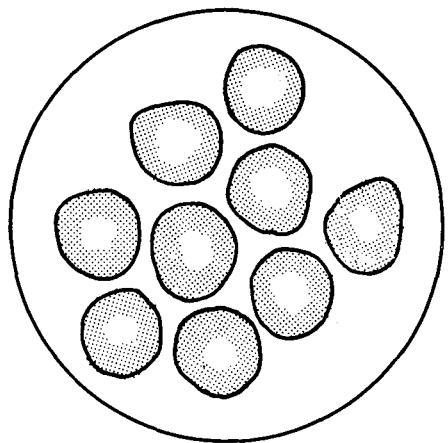
Emplacement de l'étalement trop épais; les hématies sont trop serrées.



Mauvais

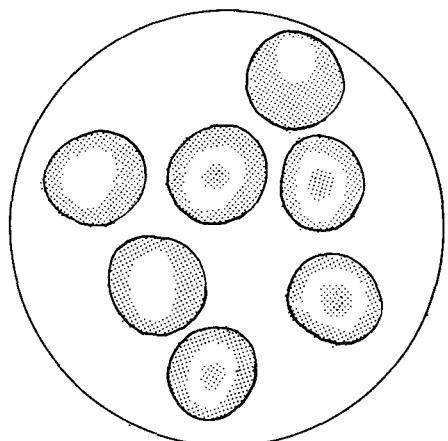
Ici, les hématies sont trop peu nombreuses.





HÉMATIES NORMALES

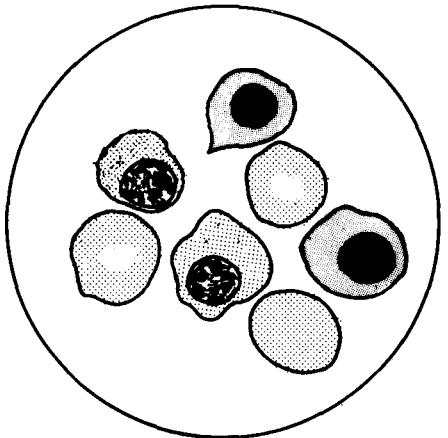
Taille 7 à 8 µm
Forme ronde, quelquefois un peu irrégulière
Coloration pourtour rose foncé, centre rose très clair ou presque incolore.



CELLULES CIBLES

Taille 6 à 8 µm
Forme ronde ou un peu irrégulière
Coloration centre et bords bien colorés, avec, entre les deux, un anneau incolore.

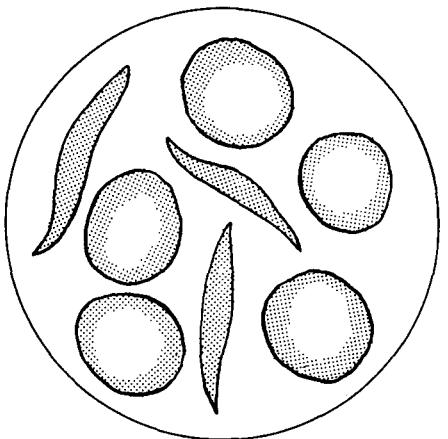
Observées dans les cas de thalassémie, d'anémies à hématies falciformes et d'autres anémies, dues à des hémoglobines anormales, ainsi que dans l'anémie ferriprive.



HÉMATIES NUCLÉÉES (NORMOBLASTES)

Taille 8 à 10 µm
Forme ronde, mais souvent irrégulière
Noyau petit, violet-noir, souvent excentrique, chromatine dense
Cytoplasme rose ou gris bleuté.

Observés dans les cas d'anémie grave comme les anémies à hématies falciformes, dans les infections bactériennes graves et les leucémies.

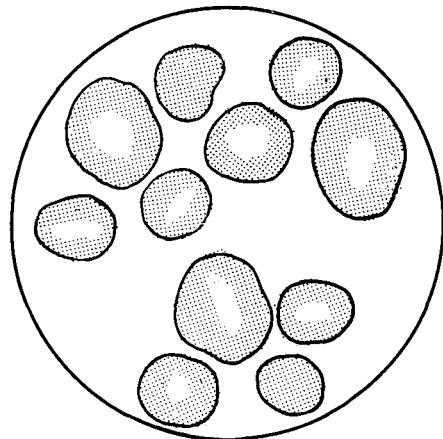


DRÉPANOCTYES

Forme allongée et étroite, avec, souvent, une ou deux extrémités recourbées et pointues.

Observées dans les cas d'anémie à hématies falciformes ou de thalassémie à hématies falciformes, à côté d'hématies nucléées, de cellules cibles et, souvent, de macrocytes.

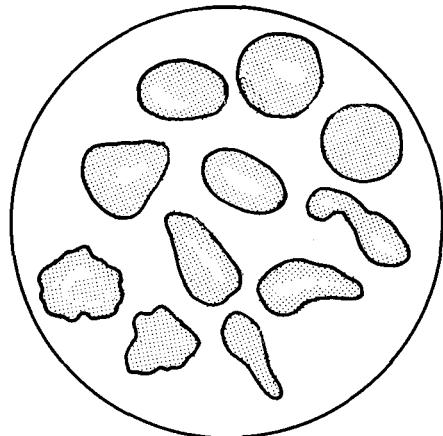
Pour l'examen des drépanocytes dans les préparations à l'état frais, voir page 411.



ANISOCYTES

Hématies de *tailles différentes* présentes dans le même étalement, par exemple: hématies de 9 µm mélangées à de petites hématies de 6 µm.

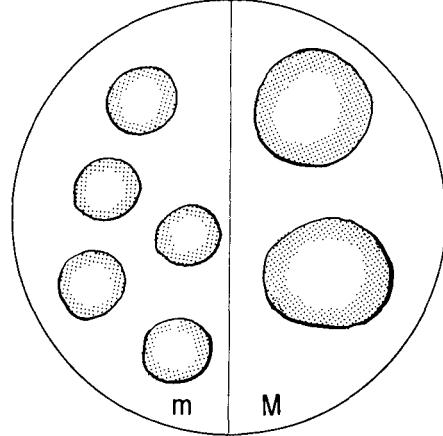
Nombreux types d'anémies.



POÏKILOCYTES

Hématies de *formes différentes* présentes dans le même étalement, par exemple: mélange d'hématies rondes, ovales, triangulaires, en forme de poire, crénelées.

Nombreux types d'anémies.



MICROCYTES (m)

Petites hématies d'environ 5 µm.

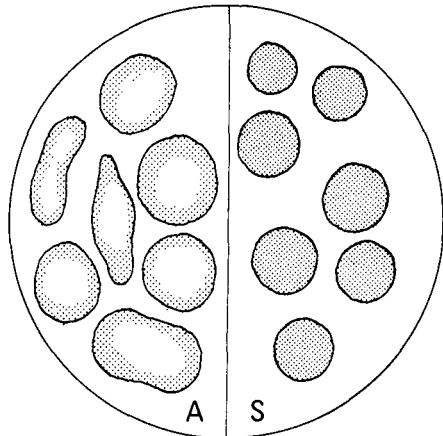
Fréquentes dans l'anémie ferriprive.

MACROCYTES (M)

Grandes hématies de 9 à 10 µm.

Observées dans les hématies macrocytiques dues à une carence en acide folique ou en vitamine B-12, ainsi que dans certaines maladies hépatiques.

Les grosses hématies colorées en bleu-mauve (polychromasie) sont des réticulocytes (voir page 414).



ANNULOCYTES (A)

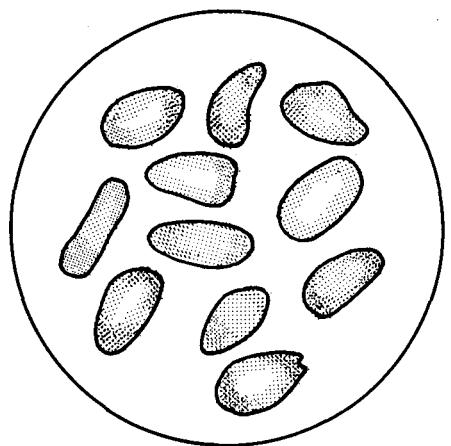
Taille normale ou légèrement réduite
Coloration seul le bord est coloré à cause de la carence en fer

Fréquentes dans l'anémie ferriprive.

SPHÉROCYTES (S)

Taille réduite (6 µm)
Forme parfaitement ronde
Coloration uniforme, toute l'hématie est colorée de façon égale et plus foncée.

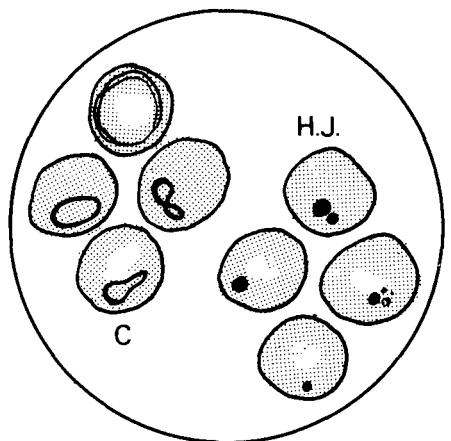
Observées dans les anémies hémolytiques.



OVALOCYTES

Taille normale ($8 \mu\text{m}$)
Forme ovale
Coloration pourtour plus foncé (notamment aux 2 pôles).

Très rares. Trouvés dans les cas d'ovalocytose héréditaire.

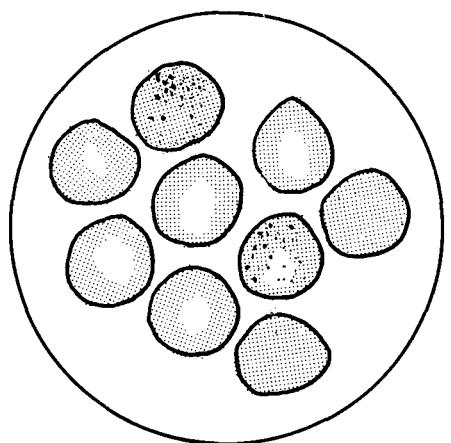


HÉMATIES AVEC CORPS DE HOWELL-JOLLY (H.J.)

Hématies contenant une ou plusieurs grosses granulations violet foncé (restes du noyau).
Ne pas confondre avec des plaquettes superposées aux hématies.

HÉMATIES AVEC ANNEAU DE CABOT (C)

Hématies contenant de minces lignes rouges, en forme d'anneau ou de huit.
Ne pas confondre avec des parasites du paludisme.



HÉMATIES AVEC GRANULATIONS BASOPHILES

Hématies contenant un certain nombre de granulations fines, bleu-violet.
Ne pas confondre avec des dépôts de colorants.

Note: Chaque fois que l'on observe des hématies à aspect anormal, difficiles à identifier, ne pas hésiter à confier la lame à un spécialiste.

29. Épreuve de falcification des hématies

Principe

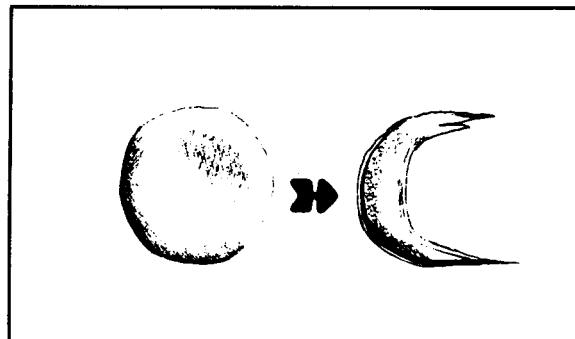
Sur une lame, on mélange une goutte de sang à une goutte de réactif au métabisulfite de sodium. Si les hématies contiennent une hémoglobine anormale "l'hémoglobine S", elles prennent la forme d'une faucale ou d'une demi-lune.

Le réactif retire leur oxygène aux hématies, et c'est ce qui entraîne cette falcification.

L'hémoglobine S constitue une anomalie héréditaire. Si elle est transmise par les deux parents, elle provoque la drépanocytose, (ou anémie drépanocytaire), qui est une maladie grave. Si elle n'est transmise que par l'un des deux parents, elle est la cause du trait drépanocytaire et entraîne une tendance à la falcification, mais n'induit généralement pas de troubles sévères.

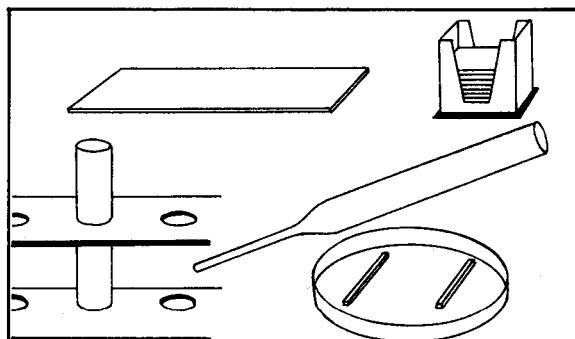
L'épreuve de falcification ne permet pas de différencier l'anémie drépanocytaire du trait drépanocytaire.

L'hémoglobine S se retrouve surtout en Afrique tropicale, mais aussi au Moyen-Orient et parmi les Noirs américains.



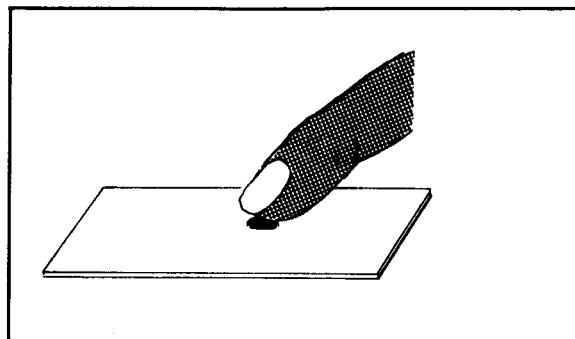
MATÉRIEL

- Lame et lamelle de verre
- Pipette Pasteur (ou pipette compte-gouttes)
- Solution de métabisulfite de sodium à 2% fraîchement préparée (réactif No. 40)
- Récipient pour éviter que la préparation ne sèche, par exemple boîte de Pétri.

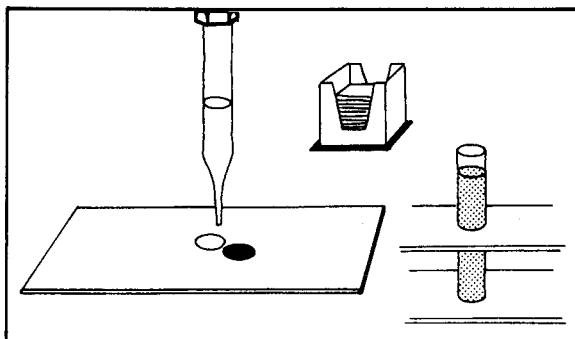


MÉTHODE AU MÉTABISULFITE DE SODIUM

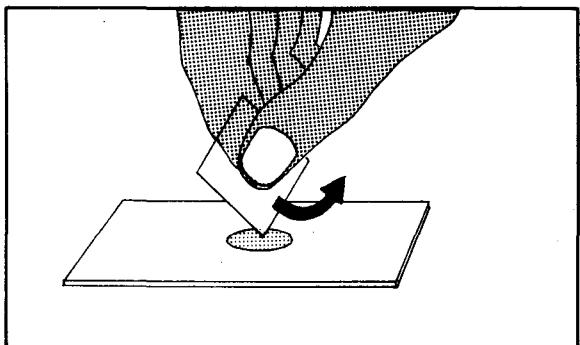
1. Déposer une petite goutte de sang capillaire (environ 0,02 ml) au centre de la lame.



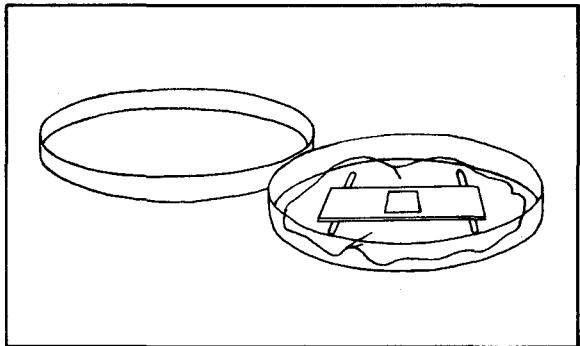
2. Ajouter 1 goutte de solution de métabisulfite de sodium d'un volume égal.



3. Mélanger soigneusement avec le coin de la lamelle.
Couvrir avec la lamelle en s'assurant qu'il ne se forme *aucune bulle d'air*.



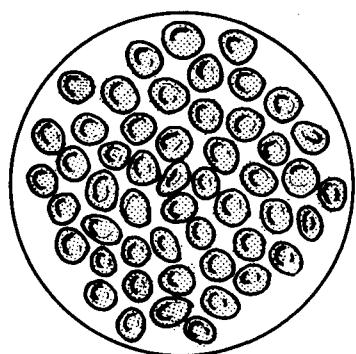
4. Placer la lame sur 2 bâtonnets, dans une boîte de Pétri dont le fond est garni de papier-filtre humide.
Note: Lorsqu'on utilise un réactif réducteur comme le bisulfite de sodium, il n'est pas nécessaire de sceller la préparation.



5. Attendre 15 minutes.
Examiner au microscope (objectif 40 x).
Si le résultat est négatif, répéter la lecture après 15 autres minutes, puis au bout d'une heure, et de nouveau 2 heures plus tard.

Résultats

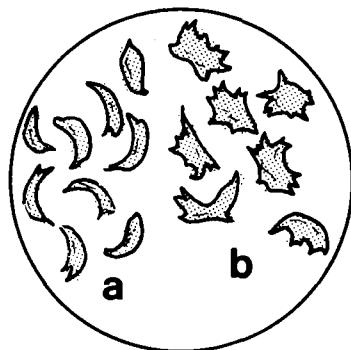
Résultat négatif: les hématies gardent leur forme ronde.



Résultat positif: les hématies prennent une forme de faucille ou de banane (a), souvent dentelée (b).

Il importe d'examiner plusieurs zones de la préparation, car la falcification peut se produire plus rapidement dans l'une que dans l'autre.

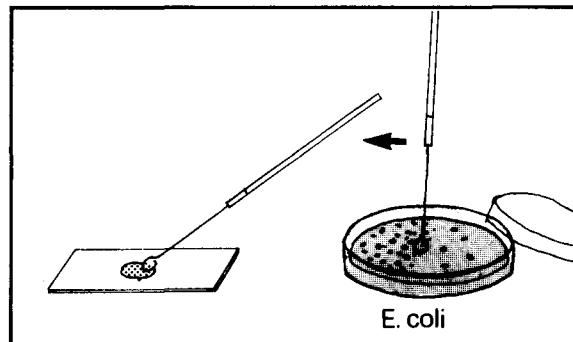
Ne pas prendre pour des hématies falciformes des hématies couchées sur le côté ou crénelées.



AUTRES MÉTHODES

1. On peut utiliser du sang veineux, pourvu qu'il ait été *fraîchement* recueilli (1 à 2 heures avant) sur anti-coagulant (sel dipotassique de l'acide EDTA).
2. Réaction en tube: il existe dans le commerce des réactifs utilisables pour cette méthode.

-
3. La solution de métabisulfite de sodium peut être remplacée par une goutte de suspension épaisse de bacille coliforme (*Escherichia coli*) prélevée sur un échantillon de selles et placée dans du soluté physiologique.



Attention:

Si le résultat est positif, examiner un étalement mince de sang. Le sang des sujets atteints d'anémie à hématies falciformes contient des hématies falciformes irréversibles, des hématies nucléées, des cellules cibles; il présente en outre une poïkilocytose marquée, et, souvent, une macrocytose. Les individus atteints du trait drépanocytaire ne sont généralement pas anémiques et la morphologie de leurs hématies est normale. Dans toute la mesure possible, on procédera à une électrophorèse de l'hémoglobine, pour confirmer le diagnostic, qui peut se faire dans un laboratoire de référence.

30. Réticulocytes

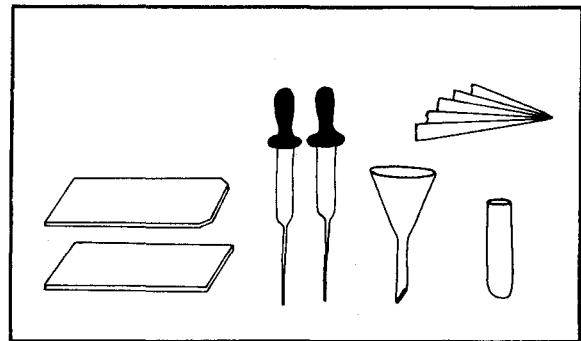
Les réticulocytes sont des hématies immatures qui passent de la moelle des os dans le sang. La quantité de réticulocytes présents dans le sang traduit la capacité de travail de la moelle et quand la moelle travaille intensément (anémies) ce nombre augmente.

Principe

Les réticulocytes contiennent de fines granulations qui peuvent être colorées par le bleu brillant de crésyl. On colore une lame de sang avec ce produit et on observe au microscope un certain nombre d'hématies. A partir de cette observation on peut calculer soit (a) le nombre de réticulocytes par litre de sang, soit (b) la proportion d'hématies qui sont des réticulocytes.

MATÉRIEL

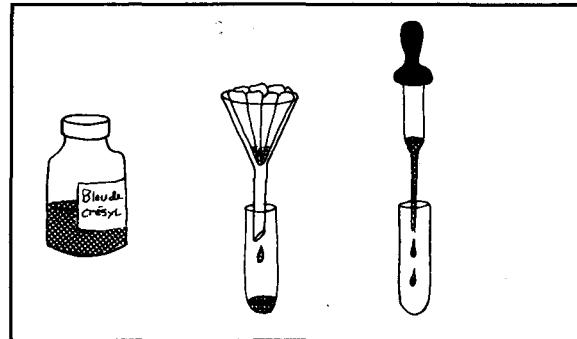
- Lames (dégraissées)
- Lame rodée pour étalement
- Petits tubes à essai
- Entonnoir
- Papier-filtre
- 2 pipettes Pasteur, avec tétines
- Compteur à main, si possible
- Solution saturée de bleu de crésyl (réactif No. 11).



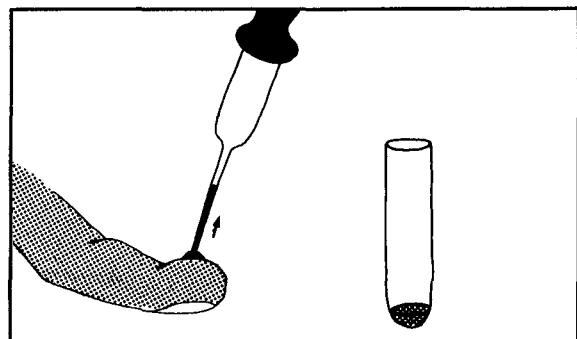
MÉTHODE

1. Filtrer un peu de solution de bleu de crésyl dans un tube à essai.

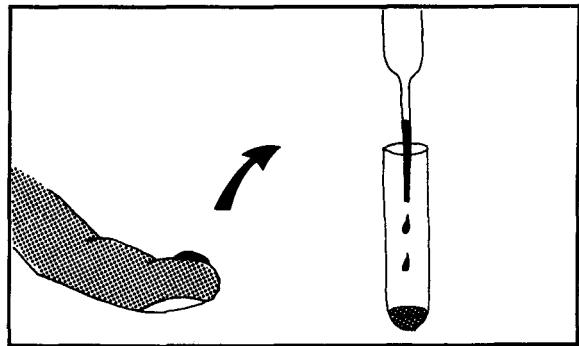
Dans le fond d'un autre tube déposer:
— 2 gouttes de solution filtrée de bleu de crésyl.



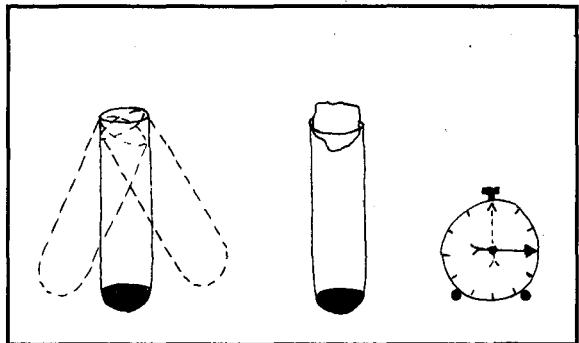
2. Prélever quelques gouttes de sang au bout du doigt à la pipette Pasteur, ou utiliser du sang veineux prélevé dans du sel dipotassique de l'acide EDTA et bien mélanger.



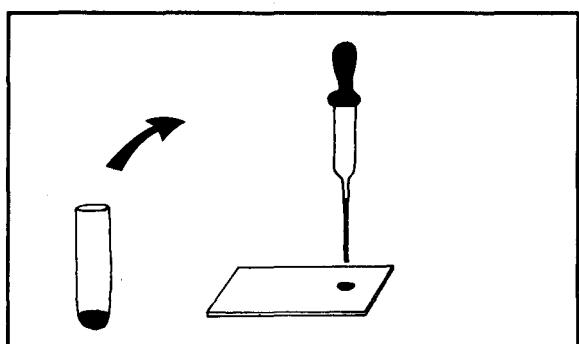
3. Ajouter au tube contenant les 2 gouttes de solution de bleu de crésyl:
– 2 gouttes de sang.



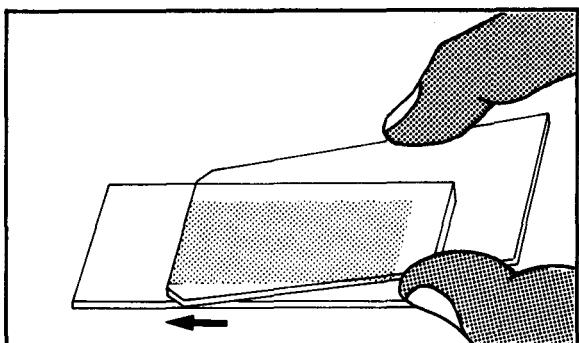
4. Mélanger en agitant doucement le tube.
Boucher le tube avec du coton cardé.
Attendre 15 minutes.



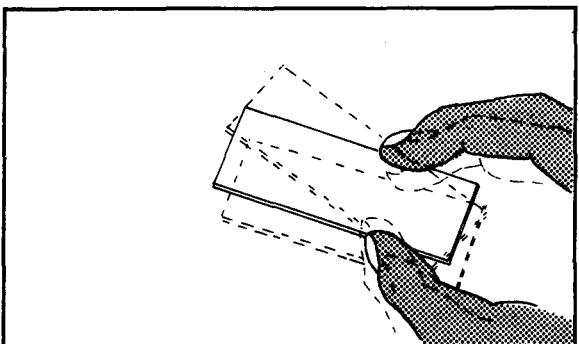
5. Reprendre le tube préparé et l'agiter doucement.
Prélever 1 goutte du mélange.
La déposer sur une lame de verre, pour étalement.

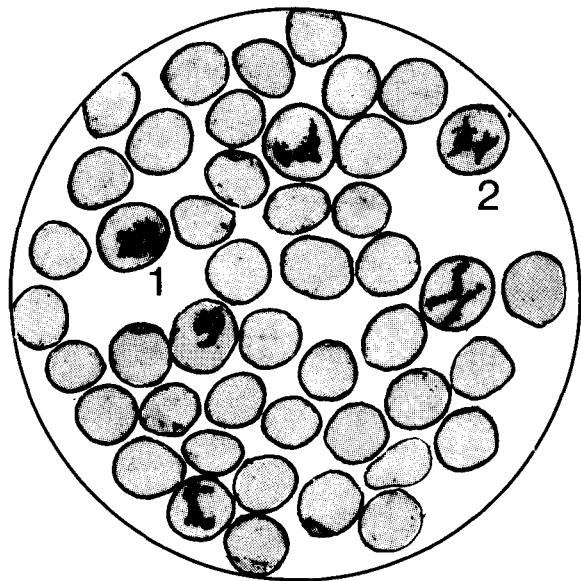


6. Faire un étalement mince du mélange avec la lame rodée.



7. Faire sécher en agitant vivement la lame.





8. Examiner la lame à l'objectif à immersion. Choisir la queue de l'étalement là où les hématies doivent être bien séparées les unes des autres.

Les hématies se colorent en bleu pâle.

Les réticulocytes sont des hématies qui contiennent de fines granulations bleu-violet foncé, disposées en filet (reticulum). Ils peuvent contenir des granulations (1) ou des filaments (2).

9. En utilisant l'objectif 100 x à immersion, examiner au moins 100 hématies. Compter soigneusement (a) le nombre total d'hématies examinées et (b) le nombre de réticulocytes. (On compte plus facilement en réduisant le champ du microscope, ce qu'on peut faire en plaçant dans l'oculaire un petit rond de papier noir rigide dans lequel on aura percé un trou d'environ 5 mm de diamètre.)

10. Certains hématologues préfèrent enregistrer le nombre de réticulocytes sous forme de concentration de nombre (nombre de réticulocytes par litre de sang), d'autres sous forme de fraction de nombre (proportion d'hématies qui sont des réticulocytes). Selon la pratique suivie par le laboratoire ou la demande du médecin, procéder comme suit: *

(a) *Concentration de nombre.* Pour la calculer, on doit connaître la concentration érythrocytaire totale. Si on l'exprime par C (compte non tenu du " $\times 10^{12}/l$ ") et par n le nombre de réticulocytes observés en examinant 500 hématies, la concentration réticulocytaire est égale à $C \times 2n \times 10^9/l$. Exemple:

$$\text{concentration érythrocytaire} = 4,5 \times 10^{12}/l$$

$$\text{nombre de réticulocytes observés en examinant 500 hématies} = 6$$

$$\text{concentration réticulocytaire} = 4,5 (2 \times 6) 10^9/l$$

$$= 4,5 \times 12 \times 10^9/l$$

$$= 54 \times 10^9/l \text{ (noter ce résultat).}$$

(b) *Fraction de nombre.* Pour la calculer, on doit connaître la concentration érythrocytaire. Si n est le nombre de réticulocytes observés en examinant 500 hématies, la fraction de nombre réticulocytaire est égale à $2n \times 10^{-3}$. Exemple:

$$\text{nombre de réticulocytes observés en comptant 500 hématies} = 6$$

$$\text{fraction de nombre réticulocytaire} = (2 \times 6) \times 10^{-3} = 12 \times 10^{-3}.$$

Note: Si l'on examine plus de 500 hématies dans un étalement de sang, le calcul devra être modifié en conséquence.

Résultats normaux

	Concentration réticulocytaire**	Fraction de nombre réticulocytaire
Nouveau-nés	$100 \times 10^9/l - 300 \times 10^9/l$	$20 \times 10^{-3} - 60 \times 10^{-3}$
Adultes et enfants	$8 \times 10^9/l - 110 \times 10^9/l$	$2 \times 10^{-3} - 20 \times 10^{-3}$

* Ces calculs et les résultats normaux sont donnés en unités SI. Traditionnellement, le nombre de réticulocytes était donné en pourcentages (soit en proportion d'hématies, exprimée en pourcentage, qui sont des réticulocytes). Si l'on examine 500 hématies dans un étalement de sang et que n d'entre elles sont des réticulocytes, on en calcule le pourcentage en multipliant n par 0,2. Exemple: sur 500 hématies examinées, 25 sont des réticulocytes. Le pourcentage de réticulocytes est donc $25 \times 0,2 = 5\%$. Les résultats normaux pour les nouveau-nés sont de 2,0% à 6,0% et pour les adultes et les enfants de 0,2% à 2,0%.

** Valeurs approximatives. La concentration réticulocytaire est fonction de la concentration érythrocytaire; voir tableau page 369.

AUTRES ÉLÉMENTS VISIBLES DANS UN ÉTALEMENT DE SANG

L'étalement coloré au bleu de crésyl brillant qui peut être utilisé pour la numération réticulocytaire peut aussi faire apparaître les éléments suivants:

Corps de l'hémoglobine H. Ils se présentent comme des points bleu pâle de taille variable; contrairement au reticulum des réticulocytes, ils sont présents dans la plupart des hématies. Ils apparaissent dans l'alpha-thalassémie ou dans l'hémoglobinoïde H.

Corps de Heinz. Ils se présentent comme des granulations bleues, de taille variable, situées dans une seule partie du globule, près de la membrane. Ils apparaissent dans les carences en glucose-6-phosphate déshydrogénase, à la suite de l'absorption de certains médicaments.

31. Vitesse de sédimentation érythrocytaire (VS)

Principe

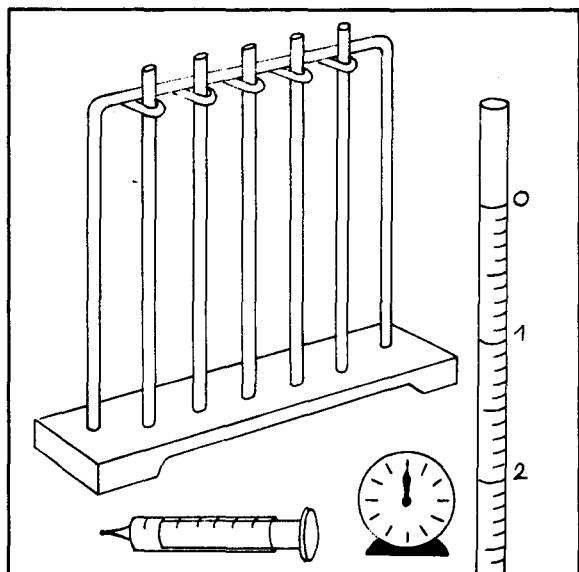
Du sang recueilli sur anticoagulant est placé dans un long tube de verre gradué tenu en position verticale.

Les hématies tombent au fond du tube, laissant surnager une couche de plasma.

La hauteur de cette couche de plasma, après 1 heure d'attente, traduit la vitesse de sédimentation des hématies.

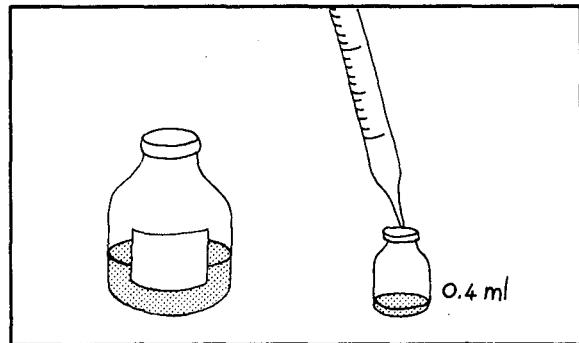
MATÉRIEL

- Tubes de Westergren:
 - diamètre intérieur 2,5 mm
 - graduations de 0 à 200 mm (souvent marquées de 1 à 20, 1 correspondant à 10, 2 à 20, etc.)
- Support pour tubes de Westergren
- Anticoagulant: solution de citrate trisodique à 3,8% (réactif No. 17) (à conserver au réfrigérateur)
- Seringue graduée de 5 ml
- Minuterie.



MÉTHODE

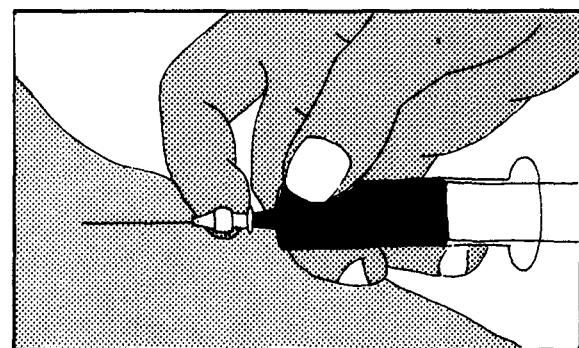
1. Placer dans un tube ou un flacon:
 - 0,4 ml de solution de citrate trisodique.



2. Prélever du sang veineux* en serrant le garrot le moins possible; piquer immédiatement la veine et relâcher le garrot.

Prélever à la seringue:
— 2 ml de sang.

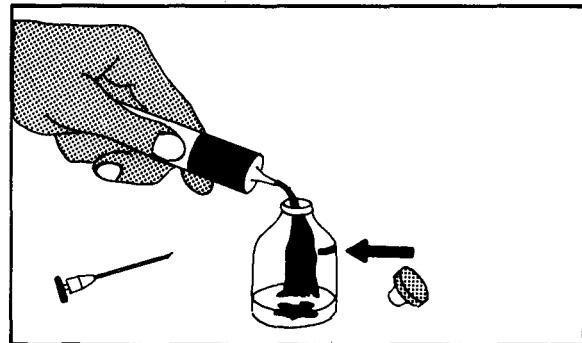
*On peut aussi utiliser du sang conservé dans un flacon contenant du sel dipotassique de l'acide EDTA.



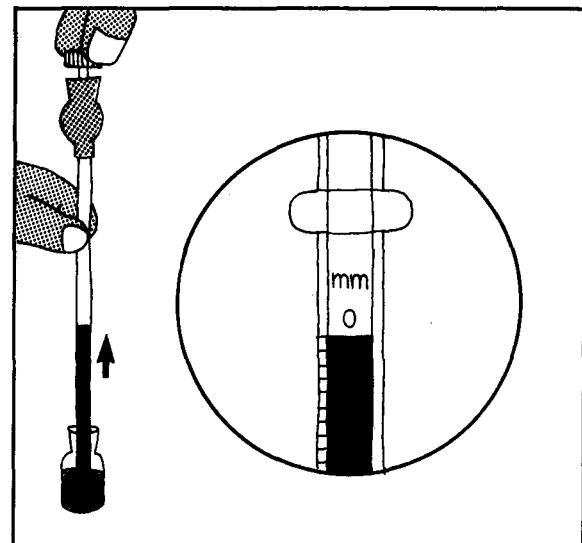
3. Enlever l'aiguille de la seringue et ajouter 1,6 ml de sang au flacon contenant l'anticoagulant (marqué 2,00 ml au total).

Agiter doucement.

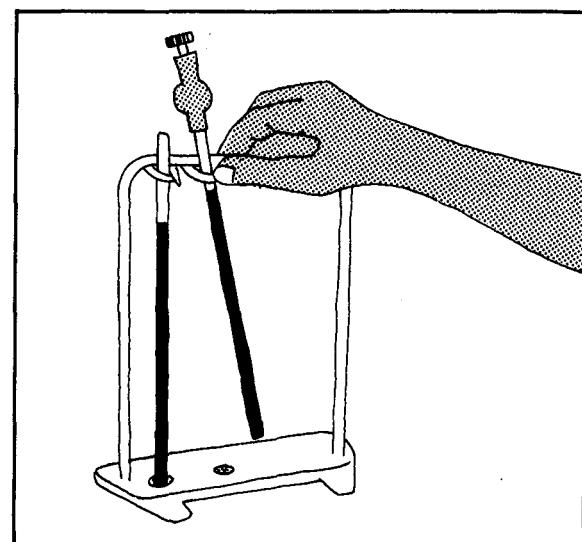
La mesure de la VS devra commencer dans les 2 heures qui suivent la ponction veineuse.



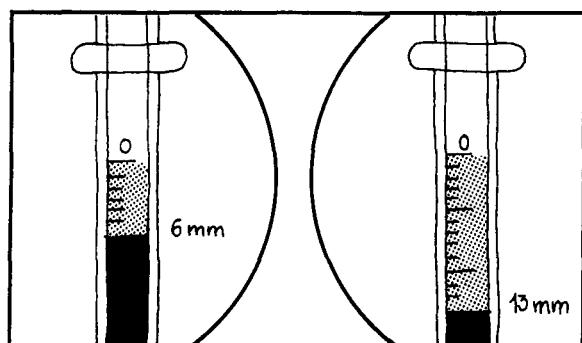
4. Aspirer le sang citraté dans le tube de Westergren (en utilisant, si possible, une poire en caoutchouc), jusqu'à la graduation 0.



5. Fixer le tube au support, en s'assurant qu'il est absolument vertical.
Vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air dans le tube.
La base du support doit être horizontale.



Attendre 1 heure (mettre la minuterie) et noter la hauteur de la couche de plasma, en mm, à partir du zéro du haut du tube.



RÉSULTATS

Le résultat s'exprime de la manière suivante:
VS mm/h.

Marge normale de variation

Hommes: 1 à 10 mm/h
Femmes: 3 à 14 mm/h.

VS et anémies

Si le malade a un nombre insuffisant d'hématies, la mesure de la VS n'a pas grand intérêt.

Il ne sert à rien de déterminer la VS chez des malades qui ont une fraction de volume érythrocytaire inférieure à 0,3 (hématocrite inférieure à 30%).

VS et déshydratation

Si le malade est déshydraté, la mesure de la VS n'a pas grand intérêt.

Augmentation de la VS

Toute maladie qui entraîne des modifications dans les protéines plasmatiques augmente la VS.

Il en est de même des affections chroniques.

On constate des VS très élevées en cas de:

- tuberculose
- trypanosomiase
- affections malignes.

En outre, la VS augmente pendant la grossesse.

Température

La VS augmente avec la température (à partir de 23°C).
Dans les pays chauds, veiller à ne pas placer le support dans un endroit chaud du laboratoire (par exemple au soleil).

Lavage des tubes de Westergren

Les rincer à l'eau, puis les faire tremper pendant 12 heures dans de l'eau propre.

Les sécher complètement (si possible, à l'incubateur à 37°C).

N'utiliser ni détergent, ni acide, ni alcool.

32. Temps de saignement : méthode de Duke

Principe

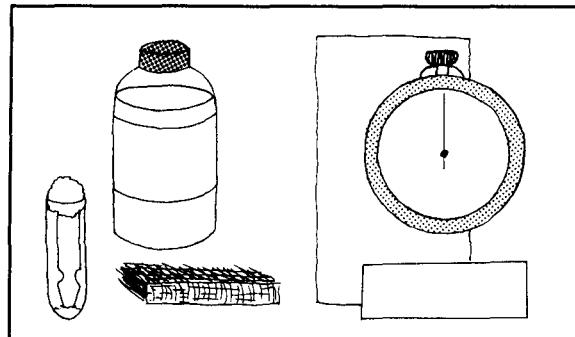
A l'aide d'un vaccinostyle, on pratique une petite incision au lobe de l'oreille. Cette blessure saigne et on mesure le temps nécessaire pour que le saignement s'arrête.

Cette épreuve est pratiquée:

- pour le diagnostic de certaines maladies hémorragiques
- avant une intervention chirurgicale
- avant une ponction du foie ou de la rate.

MATÉRIEL

- 1 vaccinostyle stérile
- Ether
- 1 lame
- Papier-filtre (ou papier buvard)
- 1 chronomètre ou, à défaut, une montre avec trottouse.



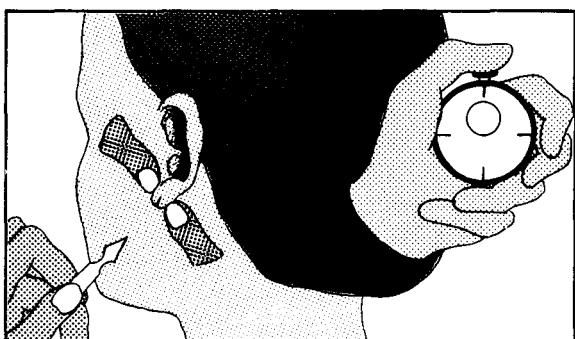
MÉTHODE

1. Nettoyer délicatement (sans frotter) le lobe de l'oreille avec l'ouate imprégnée d'éther.

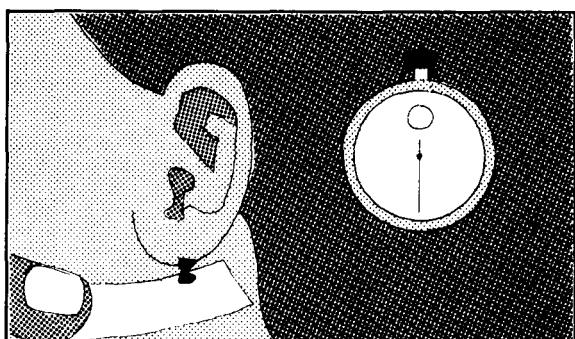
Laisser sécher.



2. Inciser profondément le lobe de l'oreille.
Déclencher le chronomètre.
Le sang doit couler librement, sans que l'on doive presser le lobe.

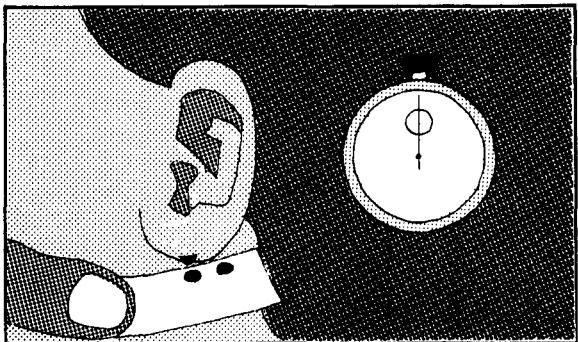


3. *Au bout de 30 secondes:*
Recueillir la 1ère goutte de sang sur un coin de papier buvard.
Ne pas toucher la peau avec le buvard.



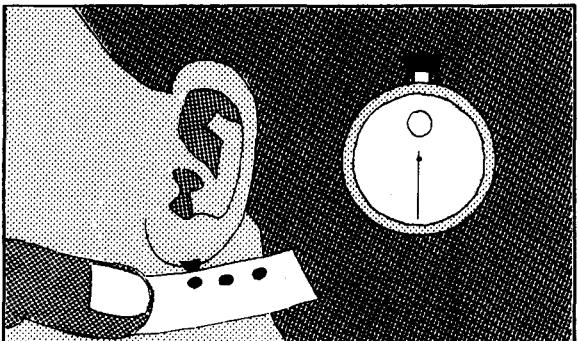
4. Attendre encore 30 secondes:

Recueillir la 2ème goutte de sang de la même manière, un peu plus loin sur la bande de papier.



5. Continuer à recueillir une nouvelle goutte de sang toutes les 30 secondes.

Les taches de sang diminuent peu à peu de diamètre.

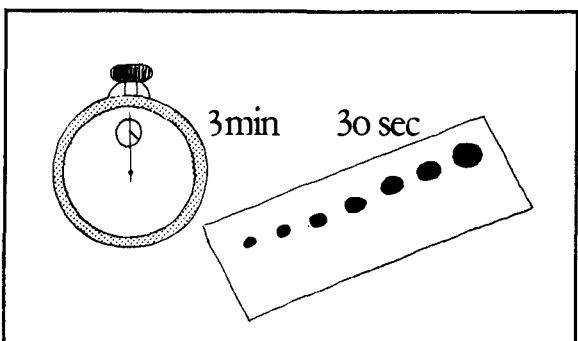


6. Quand l'incision cesse de saigner, arrêter le chronomètre (ou noter le temps à la montre).

On peut aussi compter le nombre de gouttes sur le papier buvard et le multiplier par 30 secondes.

Par exemple, il y a 7 gouttes.

Le temps de saignement est 7×30 secondes =
 $3\frac{1}{2}$ minutes.



RÉSULTATS

Noter le temps de saignement à 30 secondes près.

Mentionner également le temps de saignement normal pour la méthode utilisée.

Exemple: temps de saignement $3\frac{1}{2}$ minutes (temps normal pour la méthode de Duke 1 à 5 minutes).

Marge normale de variation

- 1 à 5 minutes

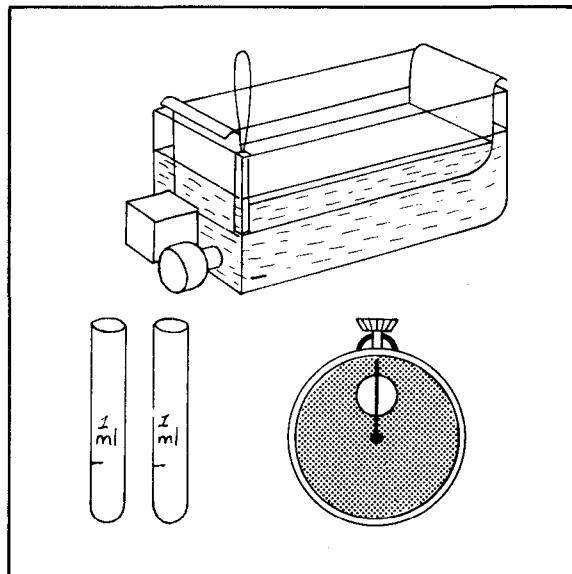
Si le temps de saignement se prolonge, examiner un étalement mince coloré par l'un des colorants de Romanowsky (voir page 391) pour voir si les plaquettes sont peu nombreuses (utiliser du sang veineux).

33. Temps de coagulation du sang total : méthode de Lee et White

Principe

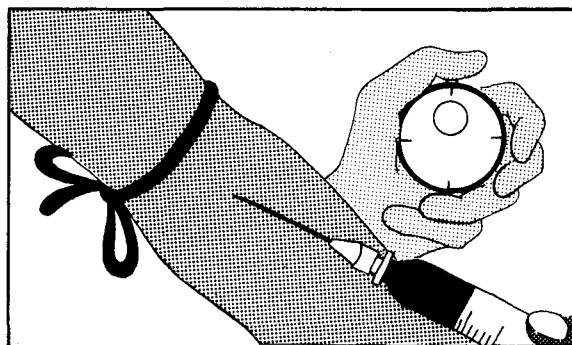
On prélève du sang veineux dans un tube de verre.
On mesure le temps qu'il lui faut pour se coaguler.

Cette épreuve n'a qu'une valeur limitée, car elle ne permet de déceler que les anomalies graves de la coagulation.



MATÉRIEL

- 2 petits tubes en verre ordinaire de 75 x 10 mm, propres, de même diamètre, marqués à 1 ml
- Chronomètre ou minuterie
- Bain-marie à 37°C ou bouteille Thermos contenant de l'eau à 37°C
- Matériel pour ponction veineuse.



MÉTHODE

1. A l'aide d'une seringue en plastique, prélever un peu plus de 2 ml de sang veineux.

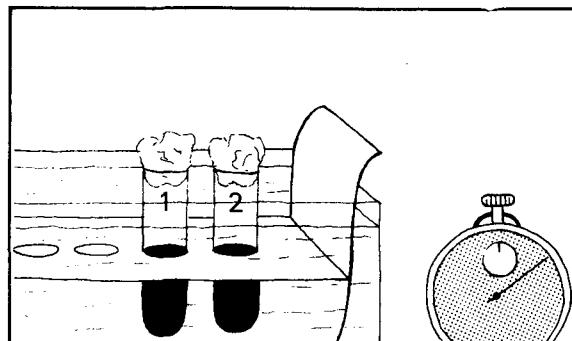
Effectuer la ponction veineuse rapidement et correctement.

Déclencher le chronomètre dès que le sang pénètre dans la seringue.

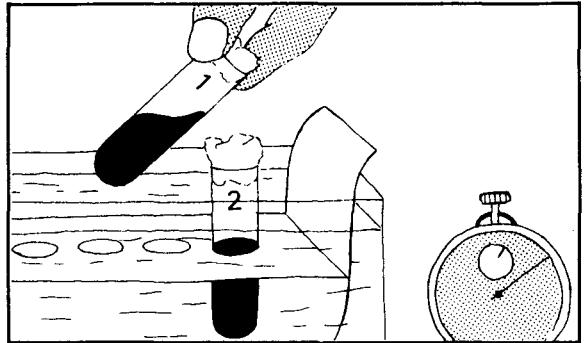
2. Enlever l'aiguille de la seringue et remplir chaque tube jusqu'à la marque 1 ml.

Boucher les 2 tubes avec du coton cardé.

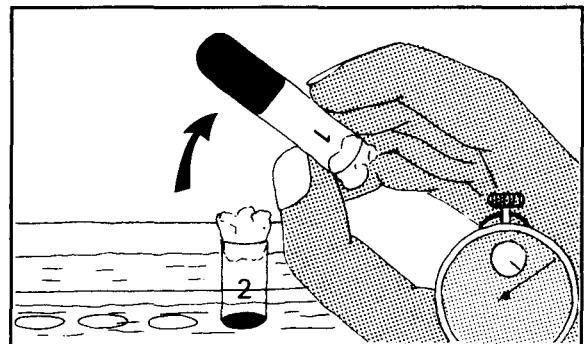
Les mettre au bain-marie à 37°C (ou dans la bouteille Thermos pleine d'eau et maintenue à cette température).



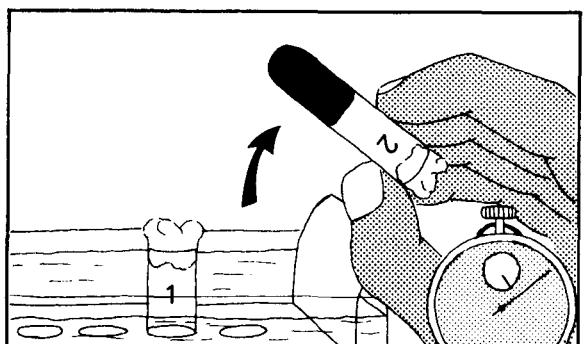
-
3. Après 3 minutes retirer le 1er tube du bain-marie.



- L'incliner à un angle de 45° pour voir si le sang est coagulé.
4. Si ce n'est pas le cas, le remettre dans le bain-marie et l'examiner toutes les 30 secondes pour voir si la coagulation s'est faite.
-



5. Dès que le sang du 1er tube est coagulé, examiner le 2ème tube.
Celui-ci se coagule généralement très peu de temps après le 1er. Arrêter le chronomètre ou noter l'heure.
Le temps de coagulation à indiquer est celui qui correspond au 2ème tube.
-



RÉSULTATS

Noter le temps de coagulation en minutes, à 30 secondes près.

Marge normale de variation

— 5 à 12 minutes.

Un malade au temps de coagulation anormalement long doit être adressé pour plus ample examen à un spécialiste.

34. Rétraction et temps de lyse du caillot

Principe

On mesure le temps de coagulation du sang total comme indiqué page 423.

On conserve les tubes:

- pour obtenir la rétraction du caillot
- pour mesurer le temps nécessaire à la dissolution du caillot (lyse).

Cet examen est utile:

- pour le diagnostic de certaines maladies hémorragiques
- avant et après une intervention chirurgicale.

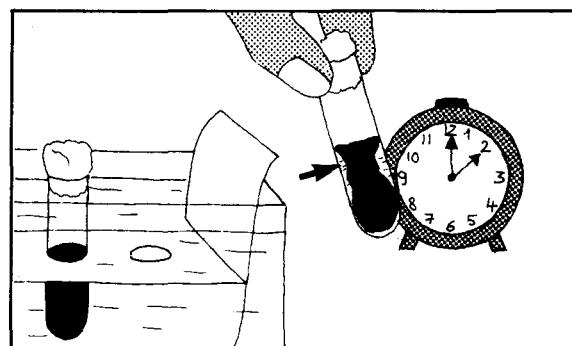
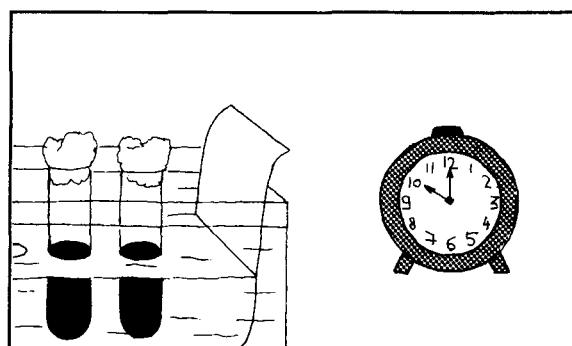
MÉTHODE

1. Laisser les tubes au bain-marie (ou à température ambiante).

Observer le caillot:

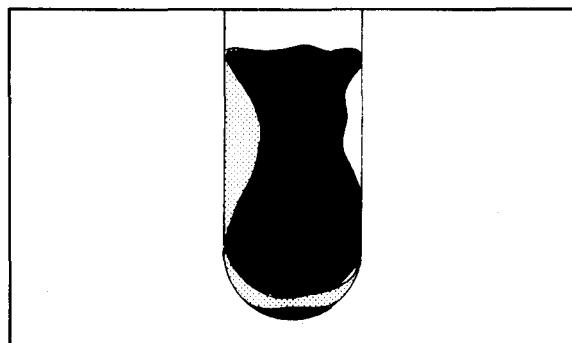
- au bout d'1 heure
- au bout de 2 heures
- au bout de 3 heures
- au bout de 4 heures.

Normalement, le caillot reste en bloc pendant les 4 premières heures, tout en commençant à se rétracter généralement dès la 1ère heure.



2. Au bout de 4 heures, observer le caillot.

Il s'est rétracté en une masse rouge, bien séparée du sérum jaune.



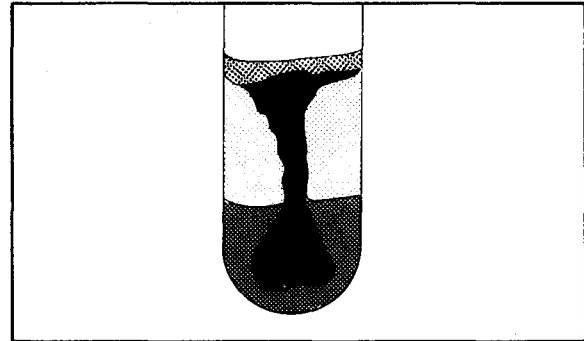
RÉSULTATS

(a) Rétraction normale

Le caillot rouge est bien séparé; en surface, il adhère aux bords du tube. Il peut y avoir au fond du tube un petit culot d'hématies sédimentées qui ne devrait pas mesurer plus de 5 mm d'épaisseur.

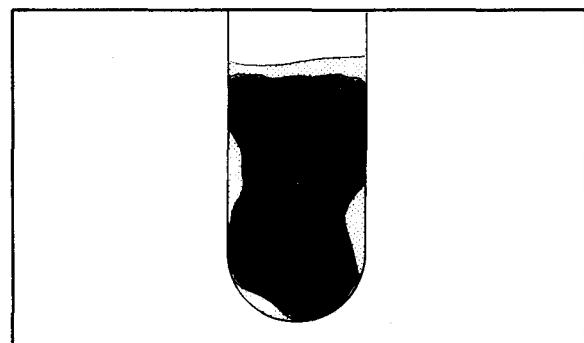
(b) Rétraction anormale

1. On observe au fond du tube un petit caillot rouge, accroché ou non aux parois par sa partie supérieure. Il est entouré d'hématies qui ont sédimenté et recouvert par le plasma-sérum qui surnage.
 - Le sang est pauvre en fibrinogène.

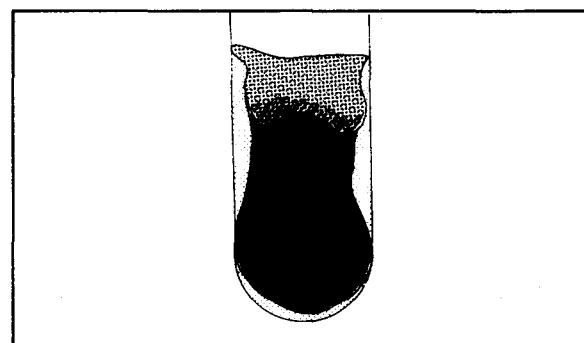


2. Le caillot rouge reste presque complètement attaché aux parois du tube; il n'est que peu ou pas rétracté. Très peu de sérum a exsudé.
 - Le sang est pauvre en plaquettes.

(Examiner un étalement mince de sang veineux préparé avec un des colorants de Romanowsky, voir page 391.)

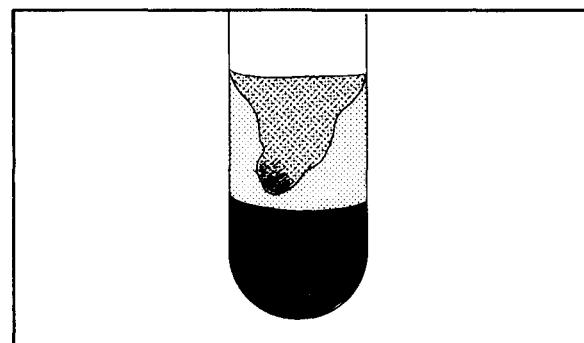


3. Il y a un caillot jaune: c'est du plasma coagulé. Au-dessous, on observe un caillot rouge, mal rétracté.
 - Cette coagulation plasmatique est due à une anomalie des protéines plasmatiques.



4. Le caillot fait totalement défaut ou s'est formé très lentement au-dessus du culot d'hématies.
 - Cela indique une anomalie grave de la coagulation, comme par exemple dans l'hémophilie, qui est une maladie hémorragique héréditaire n'affectant que les hommes.

Indiquer que la rétraction du caillot est:
— normale
— anormale, avec description du caillot.

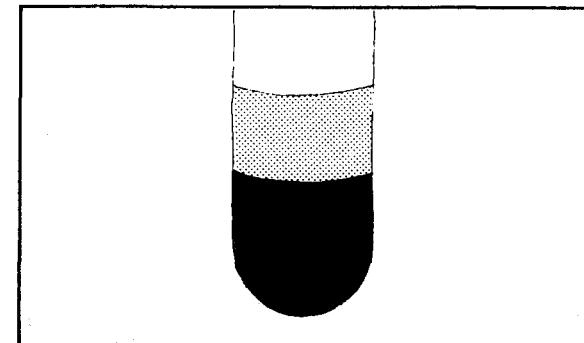


Temps de lyse

Examiner le caillot:

- au bout de 12 heures
- au bout de 24 heures
- au bout de 48 heures
- au bout de 72 heures

jusqu'à la lyse, c'est-à-dire la dissolution complète du caillot et le dépôt de toutes les hématies au fond du tube.



Résultats

Temps normal de lyse du caillot 72 heures au moins.

Temps réduit 1 à 48 heures.

En cas de fibrinolyse aiguë, le caillot peut se dissoudre en 1 à 4 heures.

Noter le temps de lyse en heures.



D. CHIMIE SANGUINE

35. Dosage du glucose sanguin et céphalo-rachidien: méthode à l'orthotoluidine

Principe

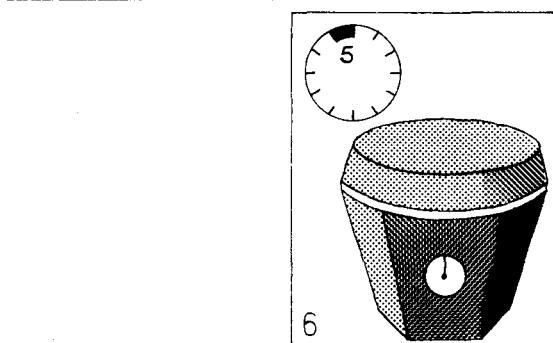
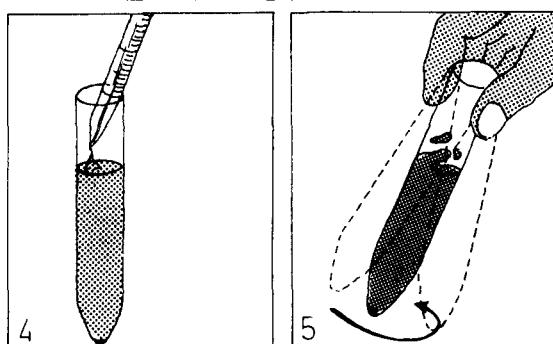
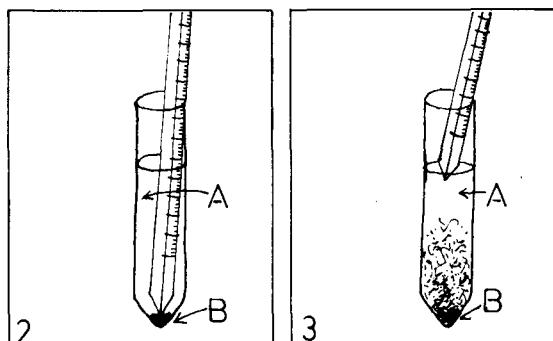
Les protéines sont d'abord précipitées au moyen d'acide trichloracétique. Mis en présence du réactif à l'orthotoluidine, le glucose du filtrat vire au vert. Cette coloration est alors mesurée au colorimètre photoélectrique.

On a besoin d'une estimation du glucose sanguin pour diagnostiquer un diabète sucré ou toute autre maladie caractérisée par une anomalie du métabolisme des glucides. Dans le diabète sucré, on constate une déficience de l'insuline, hormone qui régit le métabolisme du sucre dans l'organisme. Dans cette maladie, on retrouve généralement du glucose dans les urines (voir page 311). L'estimation du glucose céphalo-rachidien est nécessaire pour le diagnostic de la méningite (voir page 344).

MATÉRIEL

- Réactifs pour le dosage du glucose (réactifs No. 32)
 - (a) acide trichloracétique à 3%
 - (b) réactif à l'orthotoluidine
 - (c) acide benzoïque à 0,1%
 - (d) glucose: solution-mère de référence
 - (e) glucose: solution dérivée
- Colorimètre
- Sang total (capillaire ou veineux), plasma ou sérum, prélevé sur un malade à jeun*
- Tubes coniques et tubes à essai plus grands (pouvant contenir 20 ml)
- Pipettes graduées 0,1 ml (100 µl), 1,0 ml, 5,0 ml
- Bain-marie bouillant
- Sérum-témoin, à utiliser avec chaque série d'épreuves. Si le résultat obtenu avec le sérum-témoin est exact, on peut en conclure qu'il en sera de même pour le sérum du malade.

*Si l'on utilise du sang veineux, il est préférable de prendre comme anticoagulant de l'oxalate fluoruré (réactif No. 43), ce qui empêchera le glucose d'être détruit dans le sang.



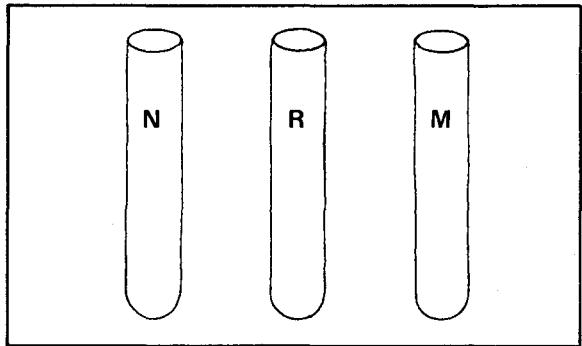
MÉTHODE

1. Dans un tube à centrifuger conique, verser à l'aide d'une pipette 1,9 ml de solution d'acide trichloracétique.
2. A la pipette 0,1 ml, verser 0,1 ml de sang total, de sérum ou de plasma (marqué B sur le schéma) au fond du tube — c'est-à-dire sous la solution d'acide trichloracétique (marquée A sur le schéma). La solution se troublera en entrant en contact avec le sang, le sérum ou le plasma.
3. Remonter la pipette et y aspirer de la solution d'acide trichloracétique de surface, de façon à rincer toute trace de sang, sérum ou plasma.
4. Vider la solution d'acide trichloracétique de la pipette dans le tube à centrifuger.
5. Bien mélanger (toute la solution deviendra trouble) et attendre 5 minutes.
6. Pour sédimenter les protéines précipitées et obtenir un surnageant clair, centrifuger pendant 5 minutes à grande vitesse.

Note: L'acide trichloracétique est corrosif. L'utiliser avec précaution.

7. Prendre 3 (ou plus si nécessaire) grands tubes à essai et les marquer comme suit:
— tube neutre — N
— tube de référence — R
— tube du malade — M

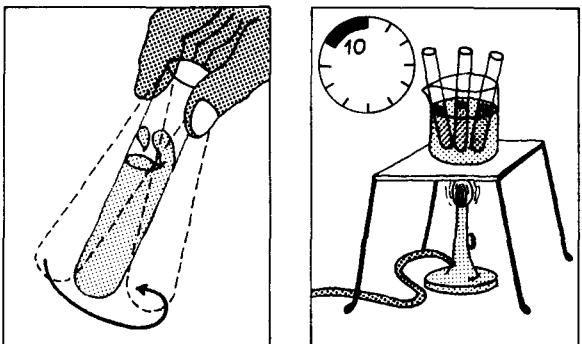
Note: Si l'on effectue plusieurs estimations, marquer sur chaque tube M le nom ou le numéro du malade.



8. Dans chaque tube, mettre à la pipette:
— tube N — 1,0 ml d'eau distillée
— 5,0 ml de réactif à l'orthotoluidine
— tube R — 1,0 ml de solution dérivée au glucose
— 5,0 ml de réactif à l'orthotoluidine
— tube M — 1,0 ml de surnageant
— 5,0 ml de réactif à l'orthotoluidine

Note: Le réactif à l'orthotoluidine est *corrosif*; pour l'aspirer dans la pipette, employer, si possible, une poire en caoutchouc.

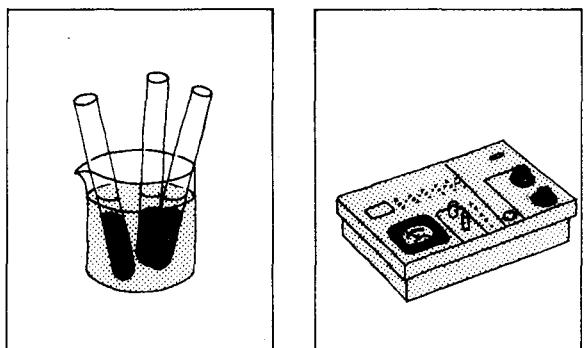
9. Agiter chaque tube pour en mélanger le contenu.
Placer tous les tubes dans un bain-marie bouillant,
pendant 10 minutes, pour faire apparaître la coloration verte.



10. Retirer les tubes et les laisser refroidir pendant 15 minutes dans un bécher d'eau froide.

Mesurer la coloration obtenue dans un colorimètre,
à une longueur d'onde de 630 nm:

- placer le filtre rouge orangé dans le colorimètre
- remplir le tube ou la cuve du colorimètre avec la solution contenue dans le tube N et le mettre dans le colorimètre
- une fois la solution N en place, mettre l'aiguille du colorimètre à zéro
- vider la cuve de la solution N, la rincer avec une petite quantité de solution R, vider la cuve et la remplir de solution R; placer la cuve dans le colorimètre et lire la densité optique DO_R
- vider la cuve, la rincer avec une petite quantité de solution M, vider la cuve et la remplir de solution M; placer la cuve dans le colorimètre et lire la densité optique DO_M



CALCULS

Calculer comme suit la concentration de glucose sanguin ou céphalo-rachidien:*

(a) *Sang*

$$\text{Concentration de glucose} = (DO_M/DO_R) \times 11,1 \text{ mmol/l (millimoles par litre)}$$

(b) *Liquide céphalo-rachidien*

$$\text{Concentration de glucose} = (DO_M/DO_R) \times 2,78 \text{ mmol/l}$$

Note: Si on a inclus un sérum témoin, faire le calcul exactement de la même façon, en remplaçant dans la formule DO_M par DO_T (densité optique de la solution témoin).

Marge normale de variation

Les concentrations de glucose sanguin chez les sujets à jeun s'établissent normalement entre les valeurs suivantes:

sang veineux, sérum ou plasma: 3 à 5 mmol/l

sang capillaire: 3,3 à 5,5 mmol/l.

Pour le liquide céphalo-rachidien, les valeurs correspondantes vont de 2,5 à 4,2 mmol/l.

Concentrations plus élevées ou plus faibles

Si l'on constate des concentrations de glucose anormalement élevées ou anormalement faibles, on répétera l'épreuve pour confirmer les résultats, comme indiqué ci-après.

Concentrations supérieures à 16,5 mmol//: Diluer les solutions N et M avec une quantité égale d'acide acétique glacial. En mettant dans la cuve de la solution N diluée, placer le colorimètre à zéro. Lire alors la densité optique DO_M avec de la solution M diluée dans la cuve. Recalculer la concentration de glucose, en utilisant la nouvelle valeur de DO_M et la valeur de DO_R obtenue précédemment. Pour obtenir la valeur exacte de la concentration de glucose, multiplier par 2 le résultat obtenu (parce que la solution M a été diluée à 1 : 2).

Concentrations inférieures à 2,2 mmol//: Si l'on obtient des chiffres aussi bas, répéter tout le processus. Au stade 1, utiliser 1,8 ml d'acide trichloracétique (au lieu de 1,9 ml) et au stade 2 utiliser 0,2 ml de sang, sérum ou plasma (au lieu de 0,1). Refaire l'épreuve et calculer le résultat exactement comme la première fois. Diviser le résultat par 2 pour obtenir la valeur exacte de la concentration de glucose.

* Les calculs sont faits en unités SI. Dans le système traditionnel, la concentration de glucose sanguin est calculée par la formule $(DO_M/DO_R) \times 2$ = glycémie en g/l; la concentration de glucose céphalo-rachidien est calculée par la formule $(DO_M/DO_R) \times 0,5$ = glycorachie en g/l. Les valeurs normales approximatives sont les suivantes: sang veineux, 0,55 à 0,90 g/l; sang capillaire, 0,60 à 1 g/l; liquide céphalo-rachidien, 0,45 à 0,75 g/l.

36. Dosage de l'urée : méthode à la diacétyle-monoxime et à la thiosemicarbazide

Principe

Les protéines sont tout d'abord précipitées à l'acide trichloracétique. Mise en présence de l'acide, du réactif oxydant et de la thiosemicarbazide, l'urée du filtrat réagit avec la diacétyle-monoxime pour donner une solution colorée en rouge. Celle-ci est alors mesurée au colorimètre photoélectrique.

L'urée est un déchet produit par le foie à la suite de la décomposition des protéines. Elle passe dans le sang, est filtrée par les reins et éliminée dans les urines.

Si les reins n'éliminent pas l'urée, sa teneur dans le sang augmente. Cela peut se produire si les tubes urinaires du rein sont endommagés ou si le volume de sang passant par les reins est insuffisant.

MATÉRIEL

- Réactifs pour le dosage de l'urée (réactifs No. 54)
 - (a) Acide trichloracétique à 10%
 - (b) Solution-mère de diacétyle-monoxime
 - (c) Solution-mère de thiosemicarbazide
 - (d) Solution dérivée de diacétyle-monoxime/thiosemicarbazide
 - (e) Réactif acide
 - (f) Réactif neutre
 - (g) Solution-mère de référence d'urée
 - (h) Solution dérivée de référence d'urée
- Colorimètre
- Sérum, plasma ou sang du malade (dans une solution de sel dipotassique de l'acide EDTA)
- Tubes coniques et tubes à essai pouvant contenir 20 ml
- Pipettes graduées de 0,5 ml (si possible) ou de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml
- Petite éprouvette de 25 ml (si possible)
- Bain-marie bouillant
- Sérum-témoin.

On utilisera un sérum-témoin ou un mélange de sérums de plusieurs malades pour chaque série d'épreuves. Si le résultat ainsi obtenu est exact, on peut en conclure qu'il en sera de même avec le sérum du malade.

MÉTHODE

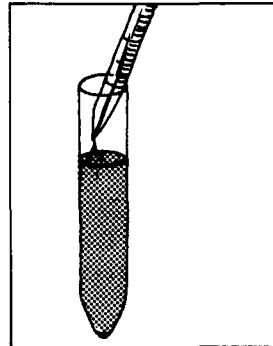
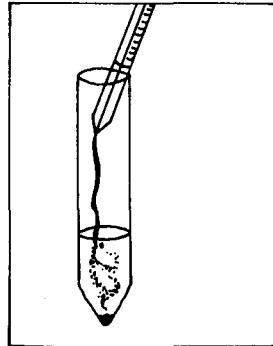
1. Préparer le réactif de coloration immédiatement avant l'emploi, en effectuant une dilution de 1 : 6 du réactif dérivé de diacétyle-monoxime/thiosemicarbazide dans le réactif acide.

Exemple: Le tube neutre, le tube de référence et le tube du malade devront contenir chacun 5 ml de réactif de coloration.

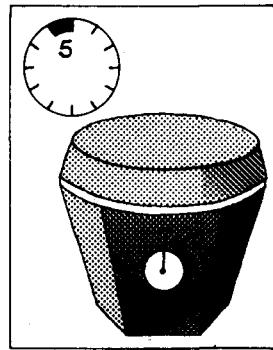
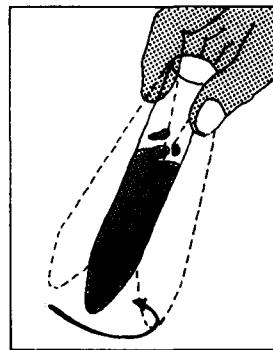
Réactif acide	Solution dérivée de diacétyle monoxime/thiosemicarbazide
Par conséquent: pour 1 dosage	15 ml
pour 2 dosages	20 ml
pour 3 dosages	25 ml
	3 ml
	4 ml
	5 ml

Mélanger le réactif dans un grand tube à essai ou un petit flacon.

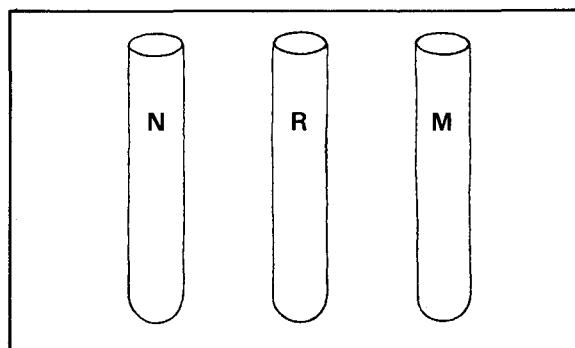
2. Verser à la pipette dans un tube à centrifuger conique:
- 0,8 ml d'eau distillée
 - 0,2 ml de sang total traité au sel dipotassique de l'acide EDTA, ou 0,2 ml de sérum ou de plasma.
- Mélanger.



3. Ajouter 1 ml d'acide trichloracétique à 10% et mélanger.
Le mélange doit devenir trouble.
Pour sédimenter les protéines précipitées et obtenir un surnageant clair, centrifuger à grande vitesse pendant 5 minutes.

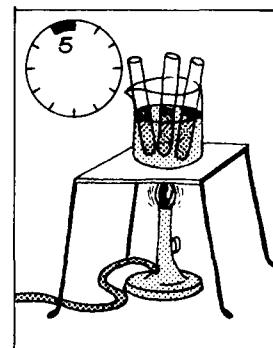
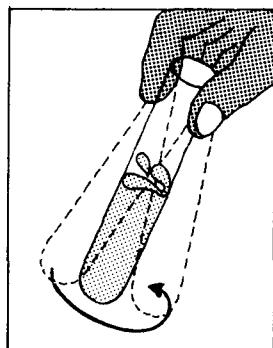


4. Prendre 3 grands tubes à essai (ou plus si nécessaire) et les marquer comme suit:
- Tube neutre — N
 - Tube de référence — R
 - Tube du malade — M.



Note: Si l'on effectue plusieurs dosages, marquer sur chaque tube M le nom ou le numéro du malade.

5. Dans chaque tube, mettre à la pipette:
- Tube N — 0,5 ml de réactif neutre
– 5,0 ml de réactif de coloration fraîchement préparé
 - Tube R — 0,5 ml de solution dérivée de référence
– 5,0 ml de réactif de coloration fraîchement préparé
 - Tube M — 0,5 ml de surnageant
– 5,0 ml de réactif de coloration fraîchement préparé.

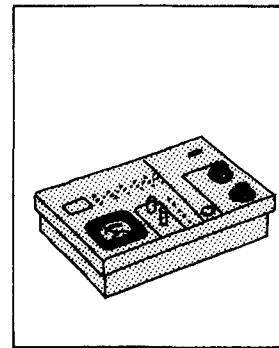
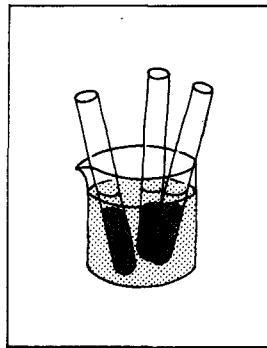


6. Agiter chaque tube pour en mélanger le contenu. Placer tous les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour faire apparaître la coloration rouge.

7. Retirer les tubes et les laisser refroidir pendant 10 minutes dans un bêcher d'eau froide.

Mesurer la coloration obtenue dans un colorimètre, à une longueur d'onde de 520 nm:

- placer le filtre vert dans le colorimètre
- remplir le tube ou la cuve du colorimètre avec la solution contenue dans le tube N et le mettre dans le colorimètre
- une fois la solution N en place, mettre l'aiguille du colorimètre à zéro
- vider la cuve de la solution N, la rincer avec une petite quantité de solution R, vider la cuve et la remplir de solution R; placer la cuve dans le colorimètre et lire la densité optique D_{OR}
- vider la solution R, rincer la cuve avec une petite quantité de solution M, vider la cuve et la remplir de solution M; placer la cuve dans le colorimètre et lire la densité optique D_{OM} .



CALCULS

Calculer le dosage de l'urée sanguine en procédant comme suit: *

$$\text{Concentration d'urée} = (D_{OM}/D_{OR}) \times 16,7 \text{ mmol/l (millimoles par litre).}$$

Marge normale de variation

Les concentrations d'urée dans le sang s'établissent normalement entre 3 et 7 mmol/l.

Valeurs élevées

Si l'on obtient une valeur supérieure à 25 mmol/l, répéter toute l'épreuve, en utilisant au stade 2, 0,1 ml de sang total traité au sel dipotassique de l'acide EDTA, ou du sérum ou du plasma, et 0,9 ml d'eau distillée. Procéder et faire le calcul exactement comme précédemment, mais diviser le résultat par 2 pour obtenir le dosage exact de l'urée.

*Le calcul est fait en unités SI. Dans le système traditionnel, la concentration d'urée sanguine est calculée par la formule $(D_{OM}/D_{OR}) = \text{concentration d'urée en grammes par litre (g/l)}$. Dans le système traditionnel, la marge normale de variation se situe entre 0,20 et 0,40 g/l. Refaire l'épreuve si l'on obtient des valeurs supérieures à 1,5 g/l.

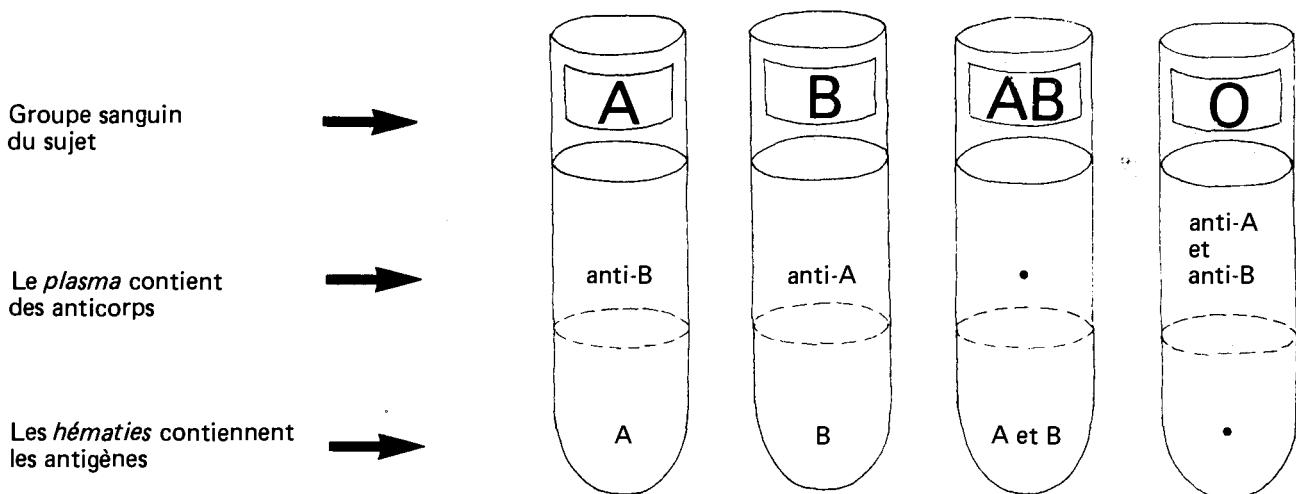
E. TRANSFUSION SANGUINE

37. Les groupes sanguins : rappel théorique

Le but d'une transfusion sanguine est de permettre à un malade de recevoir du sang en toute sécurité. Cela suppose:

- que l'on détermine le groupe sanguin ou le type de sang qui est le sien
- que l'on contrôle soigneusement que son sang est compatible avec celui d'un donneur approprié.

SYSTÈME ABO: 4 GROUPES



L'antigène A existe sous la forme d'un antigène fortement réactif A₁ et d'un antigène faiblement réactif A₂. Ce dernier se divise à son tour en 2 groupes A et AB, et en plusieurs sous-groupes: A₁, A₁B, A₂ et A₂B.

SYSTÈME RHÉSUS: 2 GROUPES PRINCIPAUX*

	Rh positif	Rh négatif
Les hématies contiennent	l'antigène D	pas d'antigène D

Normalement le plasma des personnes qui ont un Rhésus négatif ne contient pas d'anticorps anti-D.

Les anticorps Rh peuvent être produits par des sujets qui reçoivent des antigènes Rh qu'ils ne possédaient pas encore, et ceci soit par transfusion sanguine, soit lors d'une grossesse.

Autres systèmes

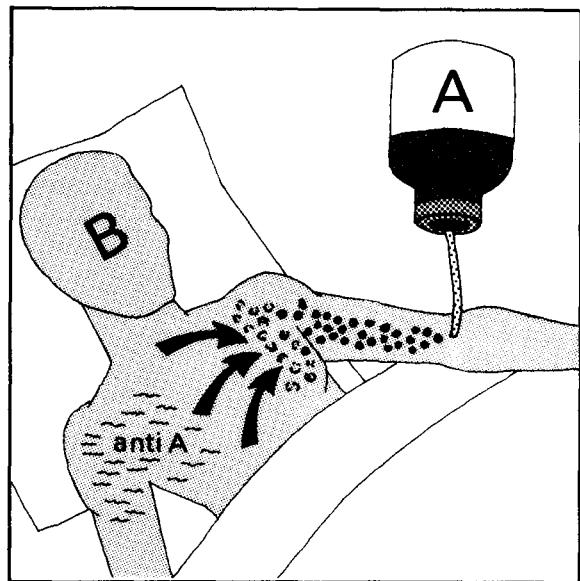
Li, Lutheran, P, Lewis, MN, Kidd, Duffy, etc. Ils sont moins importants pour la prévention des accidents hémolytiques à la naissance ou pour les réactions aux transfusions.

* Le système Rh est un système complexe qui tient compte non seulement de l'antigène D mais aussi d'autres antigènes Rh, par exemple, les antigènes C, E, c, e.

LES ACCIDENTS DE TRANSFUSION DU SYSTÈME ABO

Exemple: donneur A
receveur B.

Les hématies du sang du donneur A sont détruites par les anticorps anti-A du sang du receveur B.
Accident grave.



POUR ÉVITER LES ACCIDENTS

1. Faire un groupage minutieux pour chaque donneur et chaque receveur:
 - en testant leurs hématies (anticorps) avec des sérums-tests anti-A, anti-B et anti-AB (voir page 437).
 - en testant leur plasma ou sérum (anticorps) avec des hématies-tests A, B et O (voir page 443).
 - en testant leurs hématies pour le facteur Rhésus avec un sérum-test anti-D (voir page 448), et, le cas échéant, avec d'autres sérums-tests spécifiques du système Rhésus (laboratoires spécialisés).
2. Choisir le groupe sanguin qui convient au malade. Dans toute la mesure possible donner la préférence aux transfusions isogroupes.

Dans les petits hôpitaux, et notamment en cas d'urgence, il peut arriver que l'on doive donner à un malade du sang d'un autre groupe que le sien. Se conformer aux règles suivantes:

 - Pour un receveur A un donneur A, ou, en cas d'impossibilité, un donneur O
 - Pour un receveur B un donneur B, ou, en cas d'impossibilité, un donneur O
 - Pour un receveur AB un donneur AB, et, en cas d'impossibilité, un donneur A, B, ou O
(dans cet ordre de préférence)
 - Pour un receveur O un donneur O uniquement.
3. Faire soigneusement une épreuve de compatibilité pour assurer que le sérum du malade s'accorde avec les hématies du donneur et que la transfusion est sans danger.
4. Collaborer avec une personne expérimentée jusqu'à ce que l'on ait acquis les connaissances pratiques et théoriques voulues pour pouvoir travailler seul en toute sécurité.

38. Groupage ABO avec les sérums-tests

Principe

Les hématies sont testées avec 3 sérums-tests:

- sérum anti-A
- sérum anti-B
- sérum anti-AB.

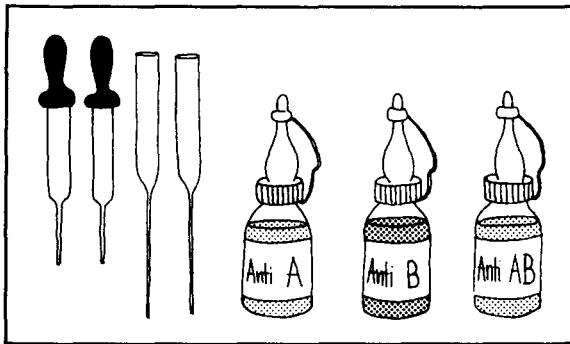
La réaction peut se faire:

- sur lame de verre
- en tube (notamment pour les cas douteux).

A. RÉACTION SUR LAME

Matériel

- Compte-gouttes calibré (20 gouttes par ml)
- Pipettes Pasteur avec tétines
- Béchers
- Centrifugeur
- Crayon gras
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Tubes 50 x 11 mm pour laver les hématies
- Hématies-témoins de groupes A, B et O.

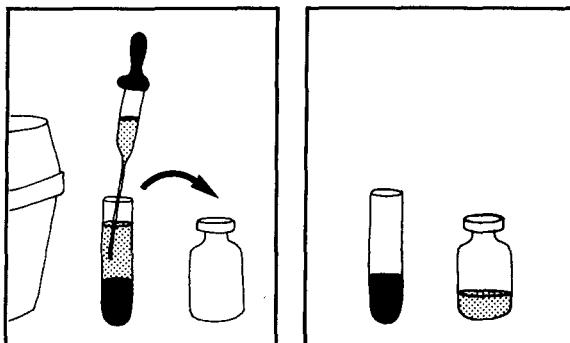


Sérums-tests anti-A, anti-B, anti-AB:

Les conserver conformément aux instructions du fournisseur, soit à 4°C, soit dans le compartiment à glace du réfrigérateur.

Si le sérum-test paraît trouble, il est probablement infecté par des bactéries et ne doit pas être utilisé.

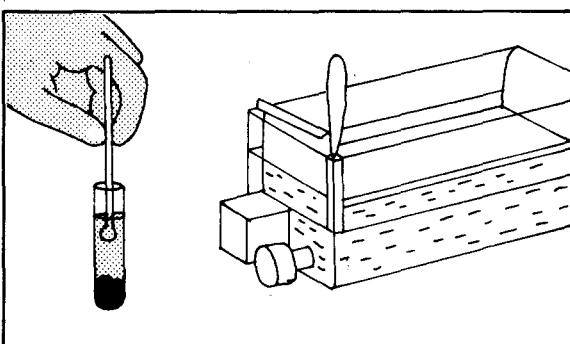
Garder les flacons ouverts au réfrigérateur, à 4°C.



1. Prélèvements de sang: séparation

Utiliser:

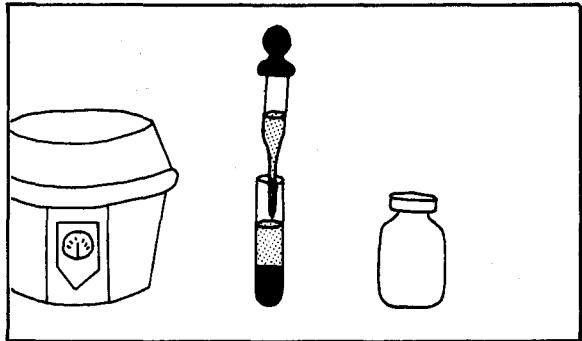
- (a) *Du sang veineux recueilli sur anticoagulant (sel dipotassique de l'acide EDTA):*
 - centrifuger 5 minutes à grande vitesse
 - prélever le plasma à la pipette Pasteur.
Le réserver pour le groupage avec les hématies-tests (voir page 443).



- (b) *Du sang veineux coagulé: 5 à 10 ml dans un tube de verre:*

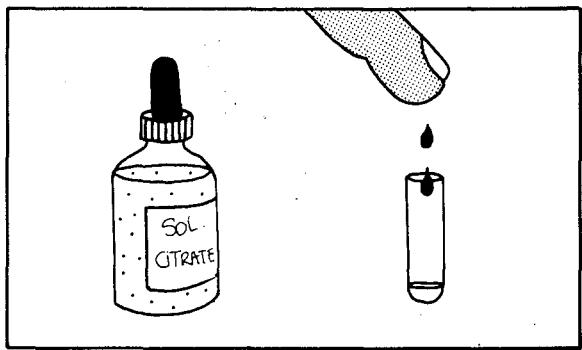
- laisser le sang se coaguler (pour favoriser la formation du caillot, placer un applicateur dans le sang et l'y laisser 15 à 20 minutes à 37°C)
- centrifuger 5 minutes à grande vitesse.

- prélever le sérum à la pipette Pasteur.
Le réserver pour le groupage avec les hématies-tests.



(c) *Du sang capillaire:*

- placer 3 gouttes de solution de citrate trisodique à 3,8% (réactif No. 17) dans un tube à hémolyse
- verser aussitôt 10 gouttes de sang dans le tube citraté: il ne coagulera pas. (C'est une méthode utile pour les nourrissons.)



2. Lavage des hématies à tester

Mélanger:

- 5 gouttes de culot globulaire
- 2 ml de soluté physiologique.

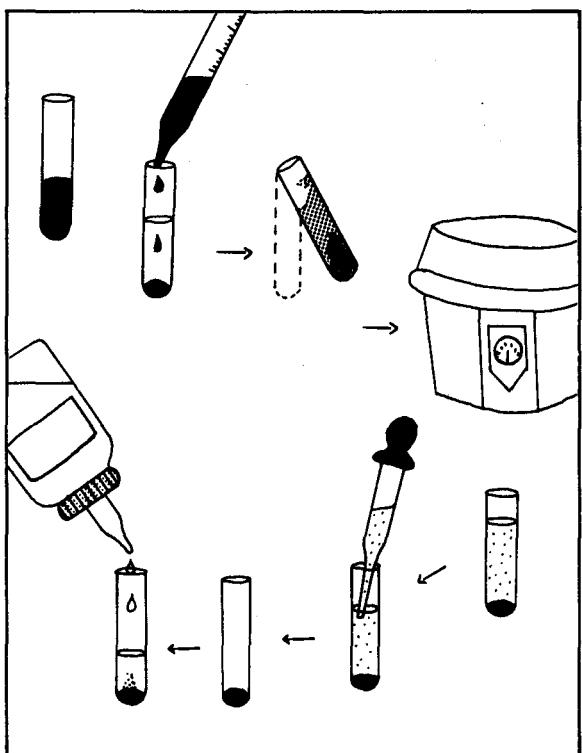
Centrifuger à grande vitesse.
Aspirer et rejeter le surnageant.

Ajouter à nouveau:

- 2 ml de soluté physiologique frais.

Agiter doucement.

On obtient ainsi une suspension d'hématies à 10%.

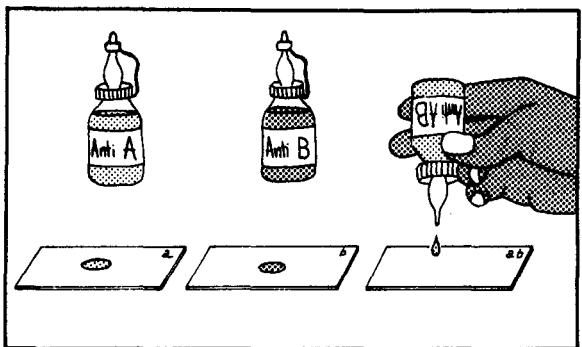


3. Réaction

Préparer et marquer 3 lames.

Placer:

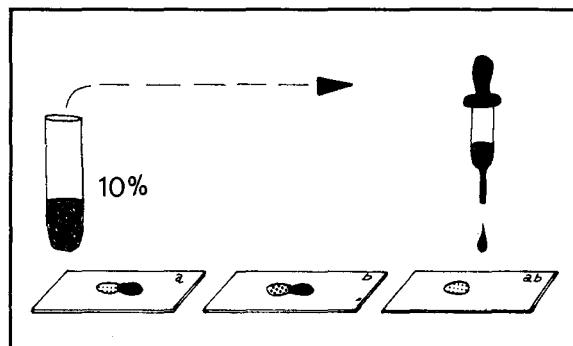
- | | | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| sur la lame No. 1 | sur la lame No. 2 | sur la lame No. 3 |
| 1 goutte de sérum anti-A | 1 goutte de sérum anti-B | 1 goutte de sérum anti-AB |



Ajouter sur chaque lame:

1 goutte 1 goutte 1 goutte

de suspension d'hématies à 10%.

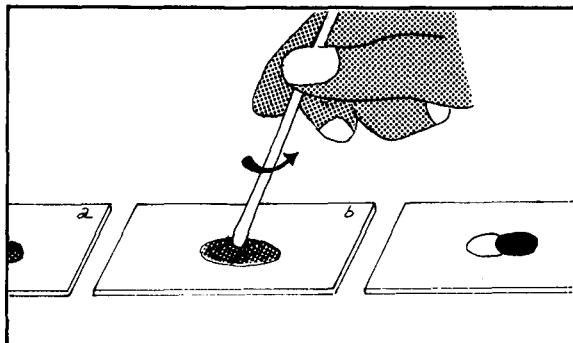


Mélanger la préparation sur chaque lame:

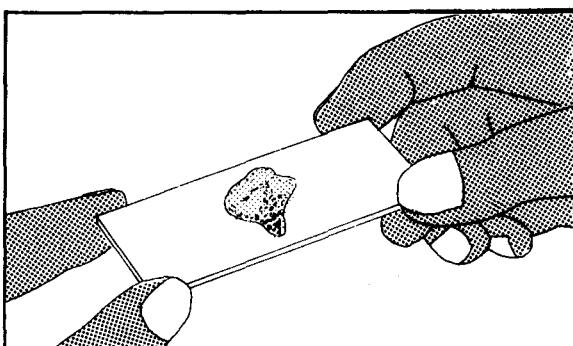
- soit avec un applicateur en bois
- soit avec le culot rond d'un tube à hémolysé
- soit avec le coin d'une lame.

Utiliser un applicateur en bois différent pour chaque lame, ou nettoyer le tube ou le coin de la lame entre chaque mélange. Ne pas transférer de matière d'une lame à une autre.

Eviter de se souiller les doigts avec le sang du malade (danger d'hépatite infectieuse).



Pour parfaire le mélange, incliner ensuite les lames d'avant en arrière. Lire la réaction dans les 2 minutes qui suivent, en s'assurant qu'il n'y a pas eu d'évaporation qui risque de fausser la réaction.



4. Lecture des résultats

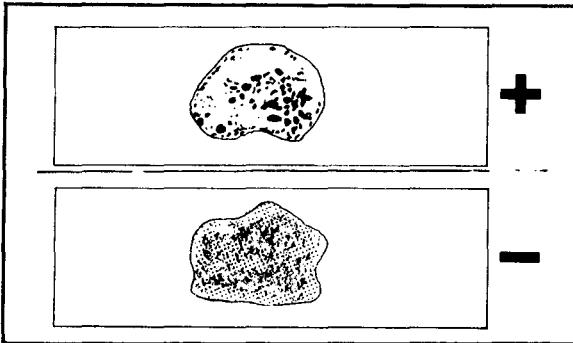
Résultat positif (+)

On voit flotter de petits amas d'hématies, bien séparées sur un fond de liquide limpide.

L'agglutination doit apparaître *en moins de 2 minutes*.

Résultat négatif (-)

Pas d'agglutination des hématies.



Résultats

Lame 1 anti-A	Lame 2 anti-B	Lame 3 anti-AB	Le sujet est du groupe
+	-	+	Groupe A
-	+	+	Groupe B
+	+	+	Groupe AB
-	-	-	Groupe O

Attention:

Ce groupage à l'aide des sérum-tests ne suffit pas pour déterminer le groupage sanguin.

Pratiquer une 2ème épreuve sur plasma ou sérum avec des *hématies-tests* (voir page 443).

B. RÉACTION EN TUBE

Les groupages en tube sont plus longs à pratiquer et demandent plus de matériel, mais les résultats sont plus sûrs. Aussi de nombreux centres de transfusion ne pratiquent que les groupages en tube. Pour les cas douteux ou difficiles à lire sur lame, il faudra de toute façon faire un groupage en tube, pour contrôle.

Matériel

Le même que pour la réaction sur lame, plus:

- tubes à hémolyse avec portoir
- miroir de microscope avec côté concave.

1. Lavage des hématies (3 lavages)

Mélanger:

- 2 gouttes de culot globulaire
- 4 ml de soluté physiologique.

Centrifuger à grande vitesse.

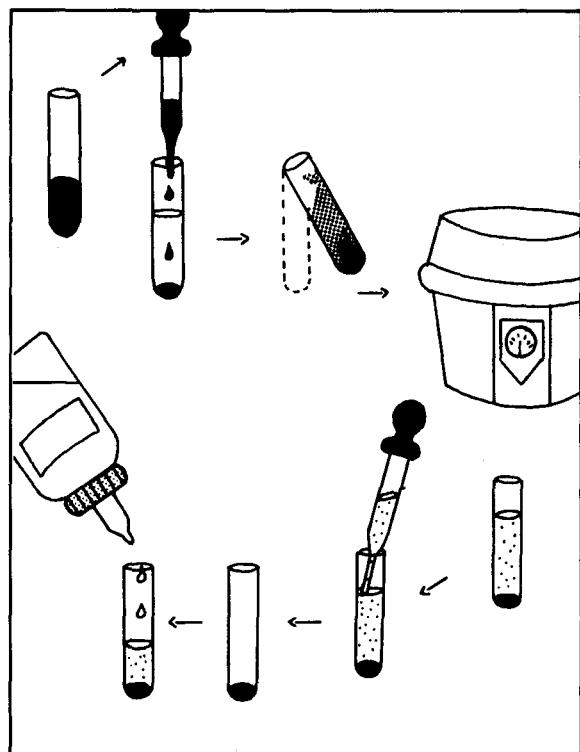
Rejeter le surnageant.

Rajouter:

- 4 ml de soluté physiologique.

Agiter doucement pour mettre en suspension.

On obtient ainsi une suspension d'hématies à 2%.



2. Réaction

Inscrire le No. du sérum sur 3 tubes.

Mettre dans les tubes:

No. 1

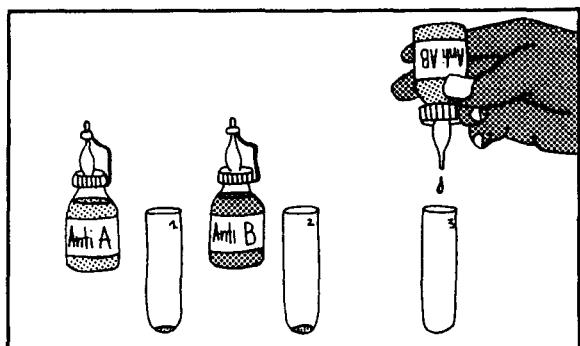
No. 2

No. 3

1 goutte de
sérum anti-A

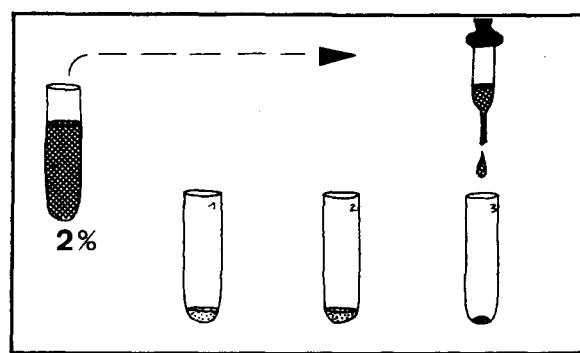
1 goutte de
sérum anti-B

1 goutte de
sérum anti-AB



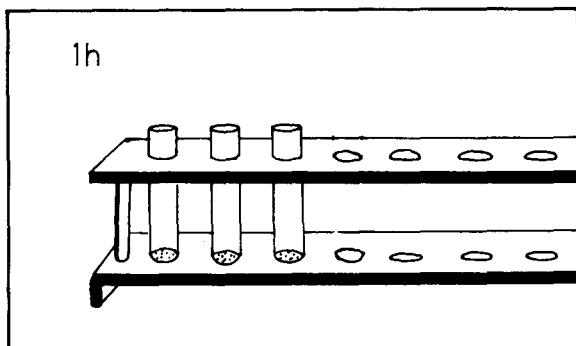
Ajouter dans chaque tube:

- 1 goutte de suspension d'hématies à 2%.



3. Incubation sans centrifugation

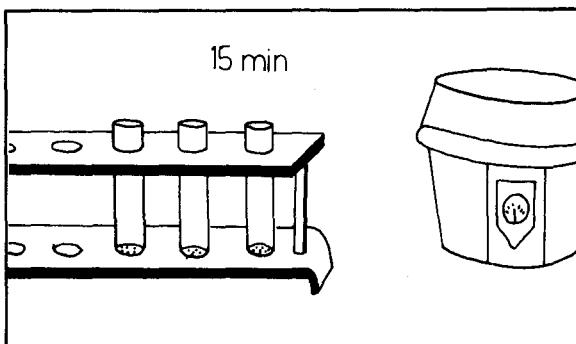
Laisser reposer les tubes *1 heure* à température ambiante.



4. Réaction avec centrifugation (méthode rapide)

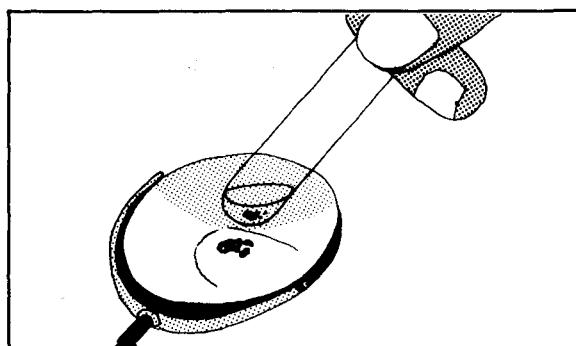
Laisser reposer les tubes *15 minutes* à température ambiante.

Centrifuger ensuite 1 minute à vitesse réduite.



5. Lecture du résultat

Agiter doucement le fond du tube et examiner le culot globulaire. On peut utiliser le miroir concave.

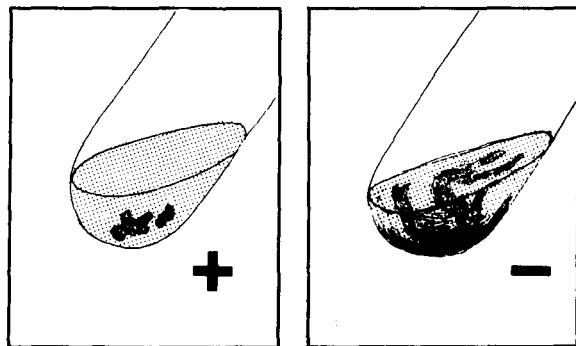


6. Résultat positif (+)

Les hématies forment un ou plusieurs blocs rouges compacts, le surnageant est limpide.

Résultat négatif (-)

Les hématies ne tardent pas à se remettre en suspension dans tout le liquide, sans former d'amas visibles.



CONTRÔLES

Vérifier comme suit les sérum-tests utilisés:

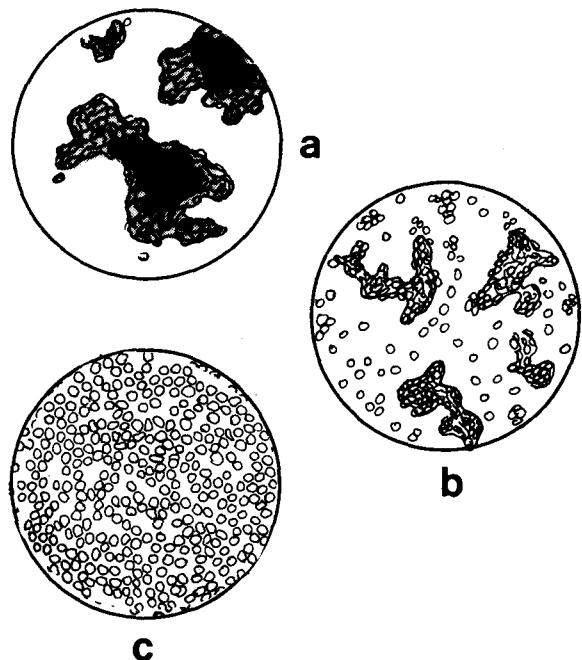
- mettre les sérum-tests anti-A et anti-B en présence d'hématies-tests du groupe A, B et O (réaction en tube).

RÉSULTATS DOUTEUX – ERREURS

1. Lecture au microscope

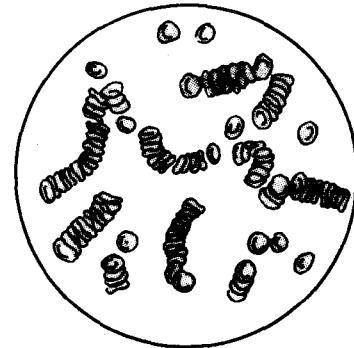
En cas d'agglutination faible, prélever une goutte du mélange hématies-sérum et l'examiner au microscope (objectif 10 x).

- (a) *Agglutination nette:*
gros amas d'hématies sur fond clair
- (b) *Agglutination faible:*
paquets d'hématies plus petits et quelques hématies libres dans le champ
- (c) *Pas d'agglutination:*
toutes les hématies sont libres.

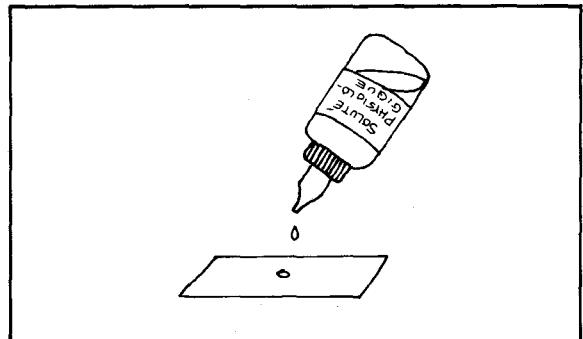


2. Formation de rouleaux

Les hématies ne sont pas agglutinées, mais empilées les unes sur les autres, comme une pile d'assiettes ou de pièces de monnaie. Il s'agit d'une fausse agglutination, difficile à distinguer à l'œil nu.



Pour disperser les rouleaux, ajouter 2 gouttes de soluté physiologique à la goutte de mélange hématies-sérum, sur la lame. S'il s'agit d'une fausse agglutination, les rouleaux auront disparu, alors que les vrais agglutinats subsistent.



Conservation des sérum-tests

1. Avant utilisation: se conformer aux instructions du fournisseur.
2. Après ouverture du flacon: dans le réfrigérateur, à 4°C.
3. Toujours garder les flacons bien bouchés et les exposer le moins longtemps possible à température ambiante.
4. Le sérum contaminé a un aspect trouble, blanchâtre. En examiner une goutte au microscope, à l'objectif 40 x. Le jeter s'il contient des bactéries.

39. Groupage ABO avec les hématies-tests

Principe

Le sérum ou le plasma qui doit faire l'objet du groupage est mis en présence de 3 suspensions d'hématies-tests:

- hématies A₁
- hématies B
- hématies O.

La réaction peut se faire:

- sur lame
- en tube (notamment pour les cas douteux).

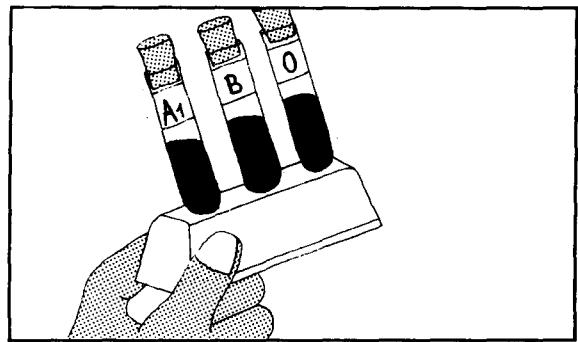
A. RÉACTION SUR LAME OU SUR PLAQUE

Matériel

Le même que pour les groupages avec les sérums-tests (voir page 437). Séparer des hématies le sérum ou le plasma du sujet comme indiqué page 437.

Réactifs — hématies-tests

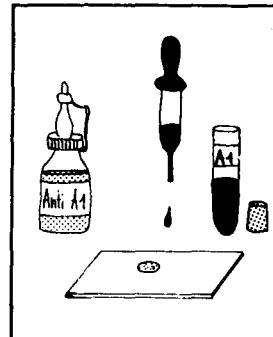
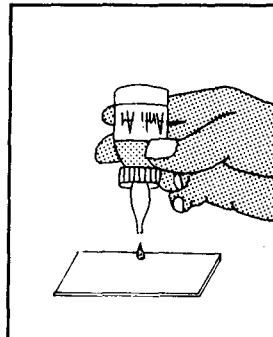
Sélectionner des échantillons de sang frais des groupes A₁, B et O.



Sang A₁

Tester plusieurs échantillons de sang A avec du sérum-test anti-A₁, comme il est dit à la page 437 (réaction sur lame) ou à la page 440 (réaction en tube).

Sur lame: s'il s'agit de sang A₁, on obtient une agglutination en moins de 30 secondes.

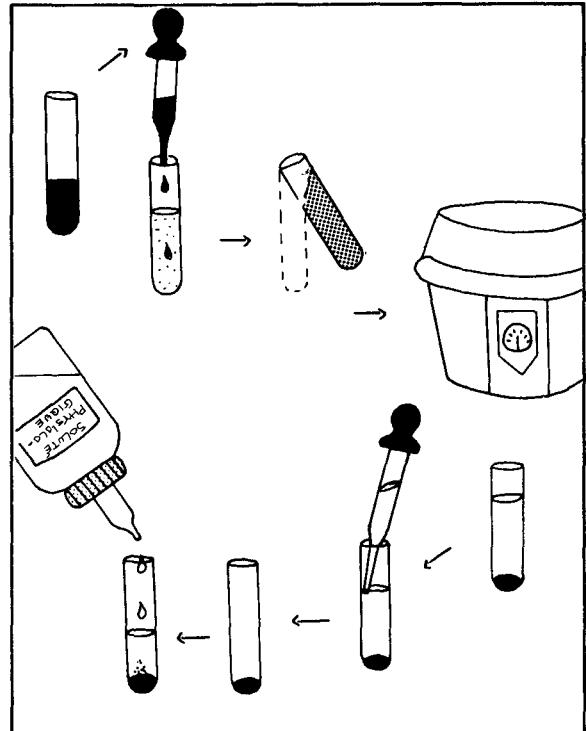


Lavage des hématies-tests

Laver les 3 types d'hématies-tests dans 3 tubes à hémolyse. Dans chaque tube, mélanger:

- 1 ml de sang total (sur anticoagulant) à 4 ml de soluté physiologique
- ou
- 0,5 ml de culot globulaire à 4,5 ml de soluté physiologique.

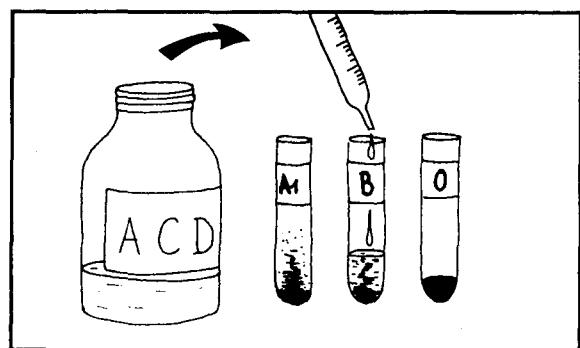
Centrifuger 5 minutes à grande vitesse. Rejeter le surnageant. Le remplacer par une quantité équivalente de soluté physiologique. Mélanger. Centrifuger. Rejeter le surnageant.



Liquide conservateur

Après lavage, mettre le culot d'hématies en suspension dans du liquide conservateur:

- soit de la solution A.C.D.
 - soit du soluté physiologique
- toujours dans les mêmes proportions:
- 4,5 ml de liquide conservateur pour
 - 0,5 ml de culot globulaire lavé.

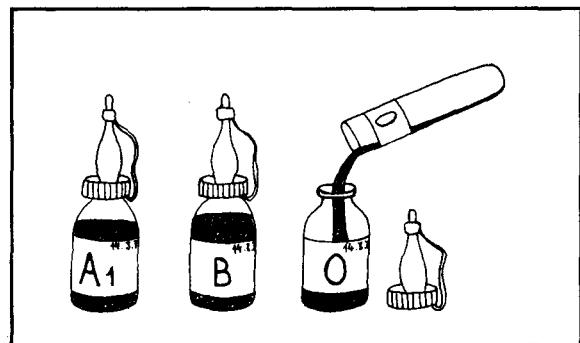


On réalise ainsi des *suspensions d'hématies-tests à 10%* à conserver au réfrigérateur à 4°C dans des flacons compte-gouttes étiquetés (date de préparation indiquée sur l'étiquette).

Durée de conservation:

- soluté physiologique — 3 jours
- ACD — 1 semaine

Solution ACD (acide-citrate-dextrose): cette solution peut être préparée au laboratoire (réactif No. 1) ou prélevée dans les bocaux pour transfusion, dont le contenu devra être jeté si on en retire la solution.



Réaction

Préparer 3 lames marquées A₁, B et O.

Placer sur

la lame A₁

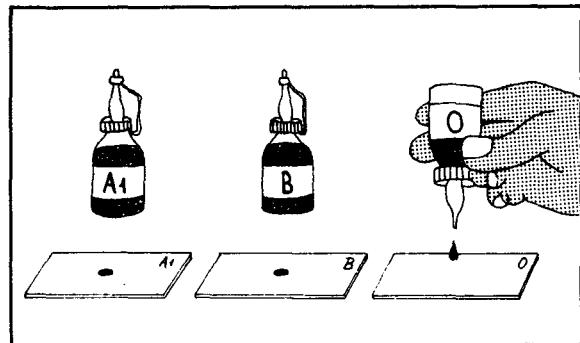
la lame B

la lame O

1 goutte de suspension d'hématies A₁ à 10%

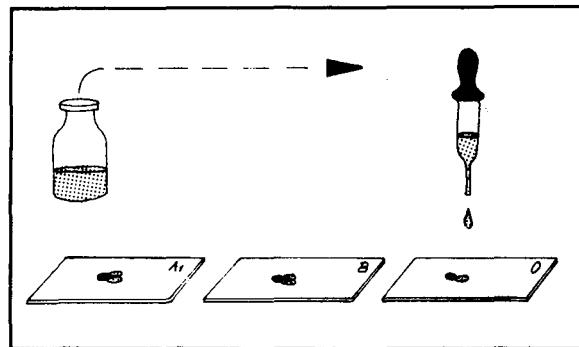
1 goutte de suspension d'hématies B à 10%

1 goutte de suspension d'hématies O à 10%

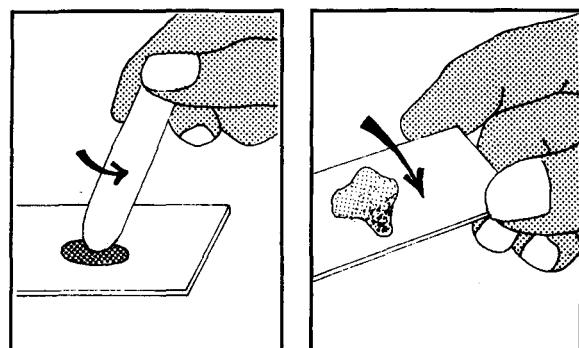


Si le liquide conservateur surnageant montre qu'il y a eu hémolyse (coloration rose), rejeter les hématies-tests.

Ajouter sur chaque lame:
2 gouttes du sérum ou du plasma du sujet.



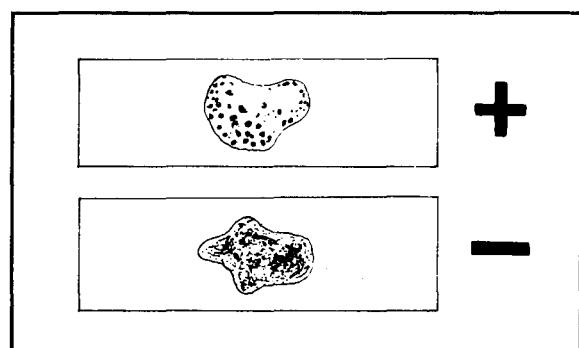
Mélanger la préparation sur chaque lame, avec un applicateur en bois ou avec le culot rond d'un tube à hémolyse. Ne pas transférer de matière d'une lame à une autre.
Incliner les lames d'avant en arrière pour parfaire le mélange.



Lecture du résultat

La taille des agglutinats est variable d'un individu à l'autre (selon que leur sérum contient plus ou moins d'agglutinines anti-A ou anti-B).

Les agglutinats sont généralement plus petits que ceux observés pour les réactions avec les sérum-tests, mais leur aspect reste voisin.



Résultats

Hématies A ₁	Hématies B	Hématies O	Le sujet est du groupe
-	+	-	A
+	-	-	B
-	-	-	AB
+	+	-	O

Comparer les résultats obtenus à ceux de la méthode avec les sérum-tests. Les deux techniques doivent donner les mêmes résultats. Si ce n'est pas le cas, répéter toute l'épreuve.

Résultats douteux

Examiner au microscope.
En cas de formation de rouleaux, procéder comme indiqué page 442.



B. RÉACTION EN TUBE

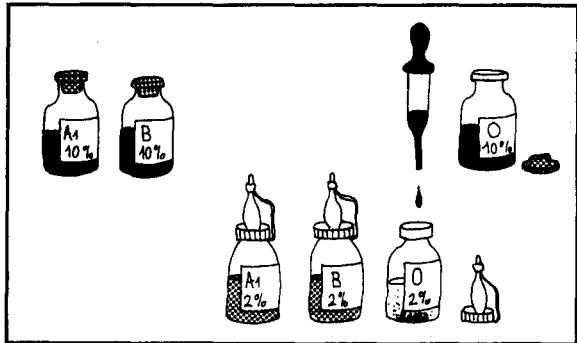
Préparation des hématies-tests (2%)

Préparer des suspensions à 2% d'hématies-tests A₁, B et O, à partir des suspensions à 10% préparées pour la réaction sur lame ou sur plaque (voir page 444).

Mélanger:

- 2 ml de soluté physiologique
- 10 gouttes de suspension à 10%.

Cette suspension à 2% doit être utilisée le jour-même.

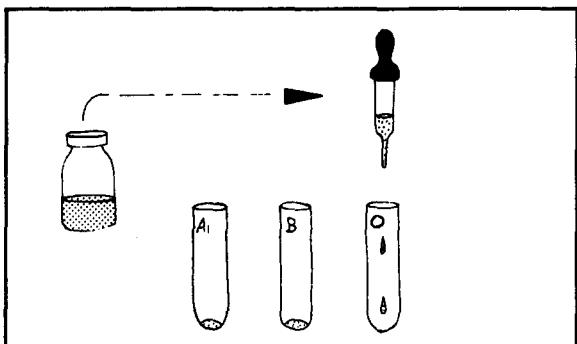


Réaction

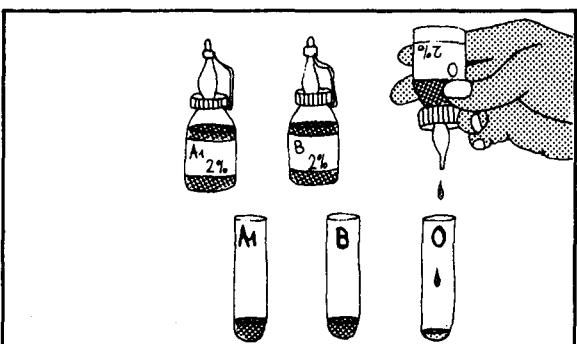
Marquer 3 tubes A₁, B et O.

Placer dans:	le tube A ₁	le tube B	le tube O
	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes

du sérum ou du plasma du sujet.



Ajouter:	tube A ₁	tube B	tube O
	1 goutte de suspension d'hématies A ₁ à 2%	1 goutte de suspension d'hématies B à 2%	1 goutte de suspension d'hématies O à 2%



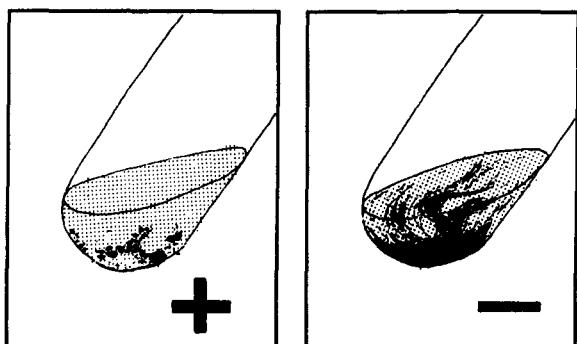
Incubation sans centrifugation

Laisser reposer les tubes pendant *1 heure* à température ambiante.

Technique avec centrifugation (méthode rapide)

Laisser reposer les tubes pendant *15 minutes* à température ambiante.

Centrifuger ensuite *2 minutes* à vitesse réduite.



Lecture du résultat

En agitant doucement le tube, examiner l'agglutination:

- Résultat positif: les hématies forment de petits amas.
- Résultat négatif: les hématies ne tardent pas à se remettre en suspension, sans former d'amas visibles.

Confrontation des résultats

	SÉRUMS-TESTS			HÉMATIES-TESTS		
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A ₁	B	O
Groupe A	+	-	+	-	+	-
Groupe B	-	+	+	+	-	-
Groupe AB	+	+	+	-	-	-
Groupe O	-	-	-	+	+	-

INTÉRÊT DU CONTRÔLE AVEC LES HÉMATIES "O"

Il permet de vérifier que le sérum du malade ne contient pas d'anticorps anormaux, qui peuvent agglutiner toutes les variétés d'hématies.

En cas de doute à ce sujet, on peut faire un test supplémentaire pour rechercher les anticorps. A l'aide d'une pipette, mettre dans un tube:

- 2 gouttes de sérum du malade
- 1 goutte de suspension à 2% de ses propres hématies.

Laisser incuber 1 heure à température ambiante. Voir s'il y a agglutination.

Une réaction positive indique la présence d'auto-anticorps. Les résultats d'un groupage effectué à l'aide des hématies lavées du malade donneront une meilleure idée de son véritable groupe sanguin.

Si l'on soupçonne la présence d'auto-anticorps ou si la réaction aux sérum-tests et aux hématies-tests ne correspondent pas aux résultats indiqués ci-après, expédier le sérum et les hématies à un laboratoire spécialisé.

POURQUOI UTILISER DES HÉMATIES A₁

Sur 10 sujets du groupe A, il y en a environ

- 8 du sous-groupe A₁
- 2 du sous-groupe A₂.

(Les autres sous-groupes A sont rares.)

Les hématies A₂ sont mal agglutinées par les anticorps anti-A des sujets B et O.

Si on utilisait des hématies-tests A₂, on risquerait donc d'obtenir des agglutinations douteuses et les résultats seraient difficiles à interpréter.

RÉPARTITION DES GROUPES ABO SELON LES RACES (estimation)

	Blancs	Jaunes	Noirs
Groupe O	43%	36%	48%
Groupe A	44%	28%	27%
Groupe B	9%	23%	21%
Groupe AB	4%	13%	4%

40. Groupages Rhésus

Principe

Les hématies sont testées à l'aide de sérum anti-D pour y déceler la présence d'antigène D.

Les sujets dont le sang contient de l'antigène D sont dits Rhésus (Rh) positifs.

Ceux dont le sang n'en contient pas sont dits Rhésus (Rh) négatifs.

La réaction se pratique à chaud : 37° à 40°C:

- sur lame
- ou en tube.

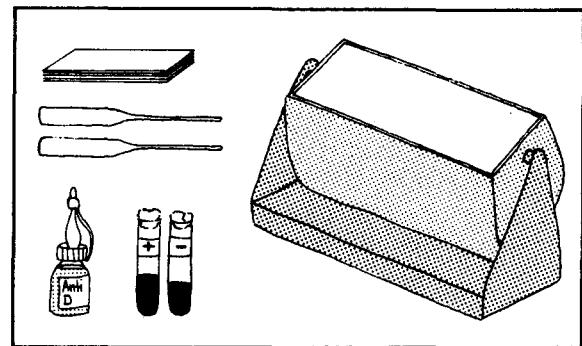
A. RÉACTION SUR LAME

Matériel

- Lames
- Pipette capillaire
- Rhésuscope (boîte chauffante électrique)
- Sérum-test anti-D*
- Echantillons de sang Rh positifs et Rh négatifs, utilisés comme témoins (si possible).

Attention:

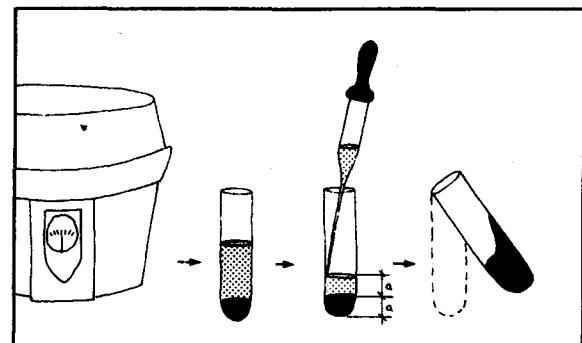
Quand on utilise du sérum-test anti-D du commerce, suivre les instructions du fabricant. Elles peuvent s'écartez de la méthode indiquée ci-après.



Préparation du sang pour le groupage

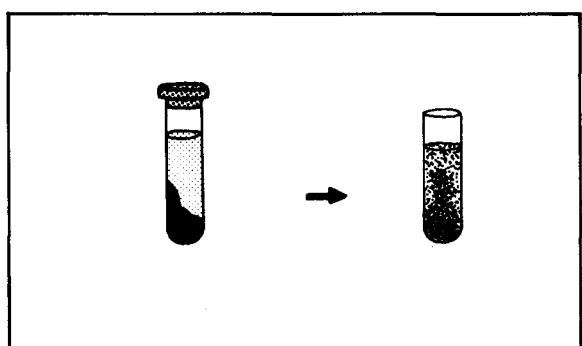
Préparer une suspension d'hématies à 50%, dans leur propre sérum ou plasma.

- (a) *Sang sur anticoagulant (sel dipotassique de l'acide EDTA)*
- Centrifuger 2 à 5 ml de sang pendant 5 minutes à grande vitesse
 - S'assurer que le volume de culot globulaire est à peu près égal à celui du plasma surnageant
 - Si l'y a davantage de plasma (sang d'anémique) retirer l'excédent à la pipette pour que les deux volumes soient égaux
 - Mélanger ensuite plasma et hématies en agitant doucement le tube.



(b) *Sang coagulé*

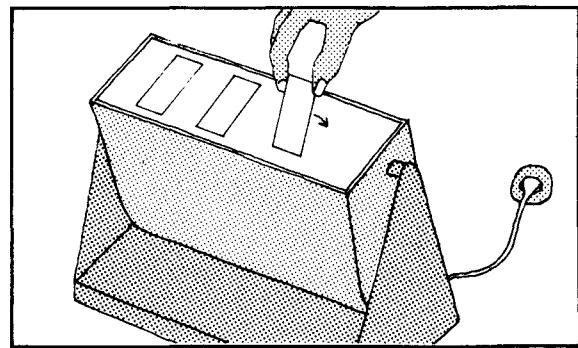
- Briser le caillot à l'aide d'une pipette capillaire pour libérer les hématies
- Transférer une partie des hématies libérées avec le sérum dans un tube à centrifuger
- Centrifuger à grande vitesse pendant 5 minutes
- Retirer à la pipette l'excès de sérum surnageant jusqu'à ce que les volumes de sérum et d'hématies soient égaux
- Mélanger en agitant doucement le tube
- Verser une goutte de la suspension sur une lame propre et l'examiner au microscope (objectif 10 x). Si elle contient des amas d'hématies, rejeter la suspension et en préparer une nouvelle en ayant soin de n'utiliser que des hématies libres.



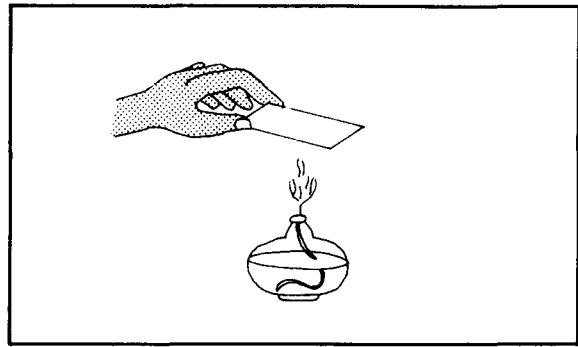
*Le sérum-test anti-D peut être du type complet, qui agglutine les hématies en soluté salin, ou du type incomplet, qui les agglutine dans l'albumine. La plupart appartiennent à ce deuxième type.

Méthode

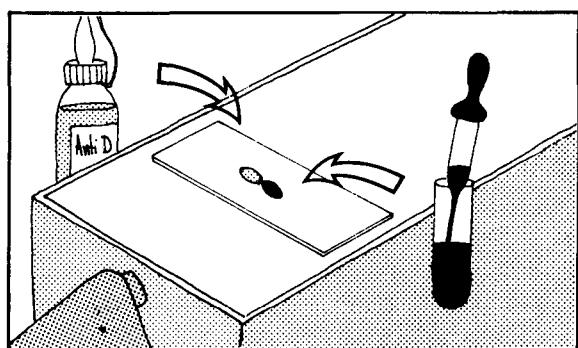
1. Allumer la plaque chauffante dont la température de surface doit être de 40°C
Y placer les lames de verre numérotées.
Laisser chauffer 5 minutes.



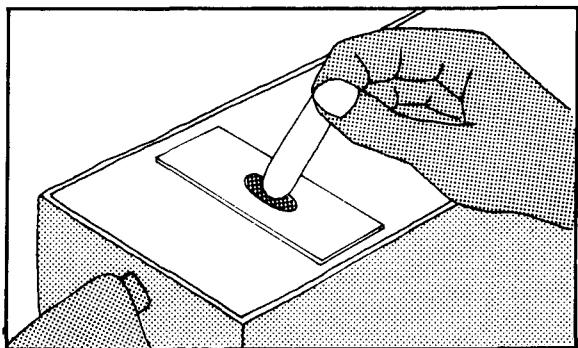
Si on ne dispose pas de Rhésuscope, on peut chauffer les lames sur une lampe à alcool, avant de faire la réaction. En contrôler la température en les appliquant sur le dos de la main: la chaleur doit être supportable.



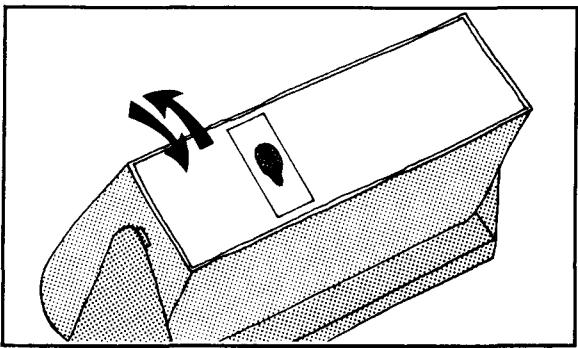
2. Placer sur la lame de réaction:
 - 1 goutte de sérum-test anti-D
 - 1 goutte du mélange hématies-sérum à tester.



3. Etaler le mélange avec un applicateur ou avec le culot d'un petit tube.



4. Continuer à mélanger en inclinant la boîte chauffante d'avant en arrière.

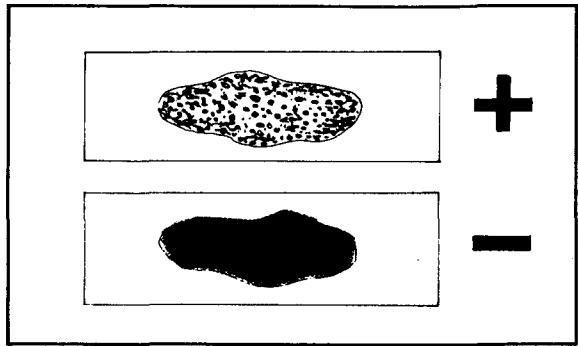


Résultats

Agglutination = Rhésus positif

Nombreux agglutinats d'hématies, nets, tant au centre que sur le pourtour de la tache étalée. L'agglutination doit se produire en moins de 3 minutes.

Pas d'agglutination = Rhésus négatif

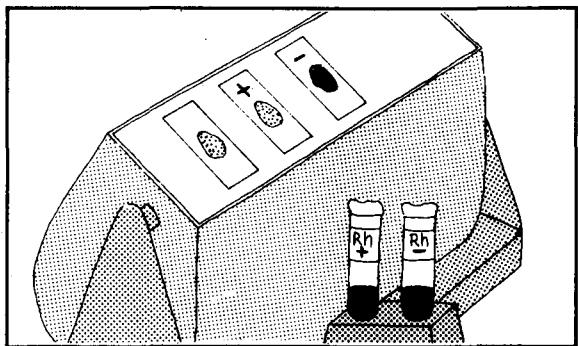


Contrôles

Pour chaque série journalière, il est conseillé de faire:

- un contrôle positif avec du sang Rh positif
- un contrôle négatif avec du sang Rh négatif (si disponible).

On peut procéder à une vérification pour les sanguins trouvés Rh positifs et suspects d'auto-agglutination, en testant les hématies du patient avec son propre sérum.

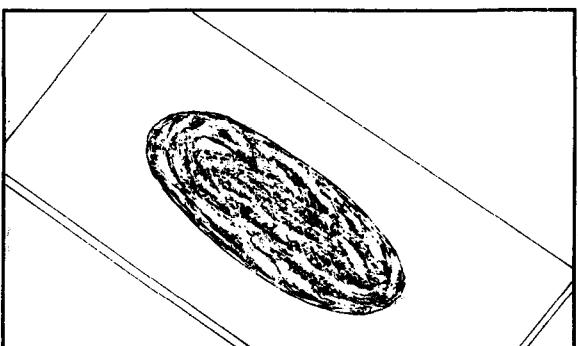


Réactions difficiles à lire

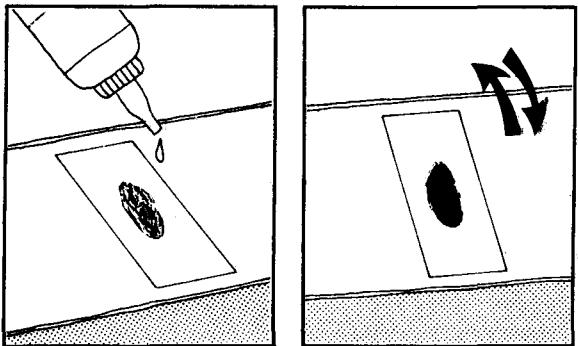
1. *Stries*

Au bout de 2 minutes, on voit apparaître des stries, surtout sur les bords de la tache.

Il s'agit de formation de rouleaux dus à l'évaporation (chaleur excessive) ou à une quantité insuffisante d'anticoagulant, ou encore à un plasma trop riche en protéines.



Déposer une petite goutte de soluté physiologique et mélanger. S'il s'agit de sang Rh négatif, les rouleaux disparaissent généralement.



2. *Faible agglutination*

Contrôler d'abord le sérum anti-D en vérifiant qu'il donne bien une forte agglutination avec un sang Rh positif connu.

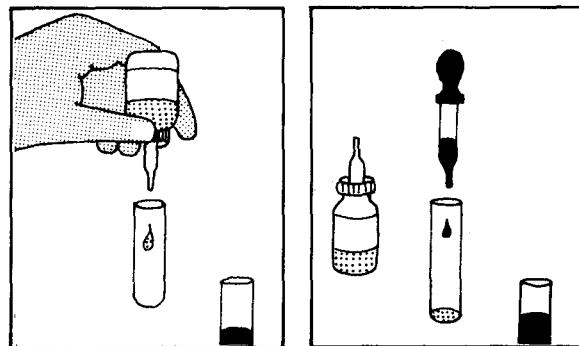
Une réaction faible peut également provenir:

- d'un type Rh intermédiaire (type Du)
- de sang contenant des anticorps rares.

Vérifier les résultats douteux par une réaction en tube (voir ci-contre, sous B). Dans les laboratoires spécialisés, le sang sera soumis à des épreuves complémentaires (test de Coombs, méthode aux enzymes, etc.)

B. RÉACTION EN TUBE

1. Préparer une suspension d'hématies à 2% dans leur propre sérum ou plasma.



2. Mettre dans un petit tube:
 - 1 goutte de sérum-test anti-D
 - 1 goutte de suspension d'hématies à 2%.

Incubation sans centrifugation

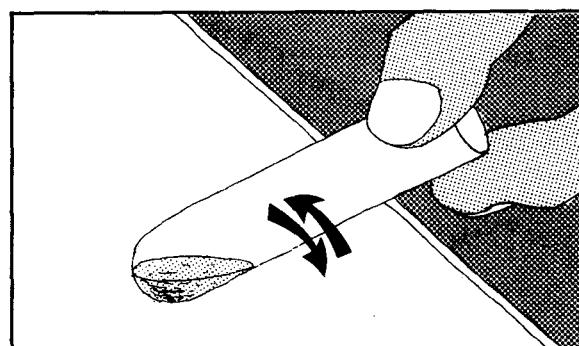
Méthode conseillée.

Laisser pendant 1 heure à 37°C (bain-marie ou incubateur).

Technique avec centrifugation (méthode rapide)

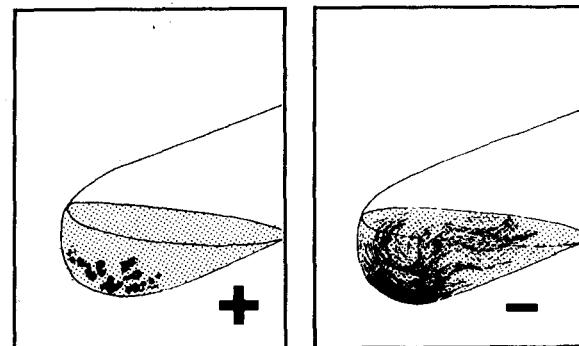
Laisser 30 minutes seulement à 37°C.

Centrifuger 1 minute à vitesse réduite.



Lecture à l'œil nu

Examiner le fond des tubes en les tournant doucement, en position presque horizontale, si possible au-dessus d'une surface illuminée (plaqué du Rhésuscope ou lampe).



Rhésus positif

On observe de petits agglutinats d'hématies dans un liquide clair.

Rhésus négatif

Les hématies se remettent en suspension homogène, sans agglutinats visibles.



Lecture au microscope

En cas de doute chauffer légèrement une lame de verre, prélever une goutte de culot globulaire à la pipette Pasteur et l'étaler sur la lame chauffée. Examiner au microscope (objectif 10 x).

C. ERREURS DE GROUPAGE RHÉSUS

1. Sérum-test anti-D contaminé par des bactéries

Le sérum a un aspect trouble, blanchâtre.
Ne pas l'utiliser.

2. Erreurs de lecture des étiquettes

3. Sang du malade hémolysé ou citraté

Le groupage des sanguins hémolysés (plasma rose) conservés plus de 2 jours au réfrigérateur est difficile. Le groupage du sang recueilli sur solution de citrate trisodique ne peut se faire que par réaction en tube.

4. Tubes trop secoués

Centrifuger pendant le temps et à la vitesse indiquée. Retirer délicatement les tubes du centrifugeur. Les tourner lentement en position horizontale. On obtient souvent à tort des résultats négatifs parce que les tubes ont été trop secoués.

5. Utilisation correcte des sérum-tests anti-D

Certains sérum-tests anti-D ne peuvent être utilisés que pour l'un des deux types de réaction. D'autres doivent être employés en milieu salin: dans ce cas, faire une suspension d'hématies à 2% dans du soutien physiologique et pratiquer une réaction en tube. Toujours vérifier les indications portées sur les flacons de sérum-tests.

D. INTÉRÊT DU GROUPAGE RHÉSUS

1. Transfusions multiples

Exemple: malade O Rh négatif

- 1ère transfusion: il reçoit du sang O Rh positif et développe des anticorps anti-D.
- 2ème transfusion: s'il reçoit encore du sang O Rh positif, les anticorps anti-D risquent d'agglutiner les hématies Rh positives (D) du donneur.

2. Maladie hémolytique du nouveau-né

Exemple: mère Rh négative

- 1ère grossesse: elle a un enfant Rh positif. Pendant l'accouchement, certaines des hématies du fœtus (contenant des antigènes D) peuvent passer dans son sang, si bien qu'elle produira des anticorps anti-D.
- 2ème grossesse: elle a un 2ème enfant Rh positif. Les anticorps anti-D de la mère peuvent hémolysier les hématies du fœtus qui risque de présenter à la naissance une maladie hémolytique.

Aussi est-il conseillé de soumettre toutes les femmes enceintes à un groupage Rhésus.

RÉPARTITION DE L'ANTIGÈNE D

Asie du Sud-Est et Pacifique	98 à 100% Rhésus positif
Equateur et Chili	91 à 97% Rhésus positif
Brésil et Argentine	82 à 94% Rhésus positif
Afrique (Bantous, Ethiopiens)	94 à 97% Rhésus positif
Afrique (Autres Noirs)	82 à 94% Rhésus positif
Europe Occidentale et Amérique du Nord	80 à 85% Rhésus positif

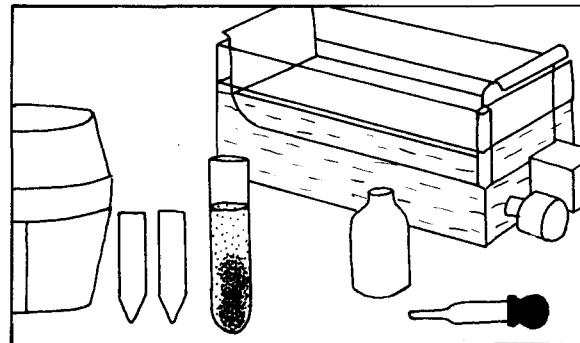
41. Epreuve de compatibilité

Principe

L'épreuve de compatibilité est pratiquée pour prévenir les accidents de transfusion. Le but recherché est de déterminer si le sérum du receveur contient des anticorps qui risqueraient d'agglutiner les hématies du donneur.

MATÉRIEL

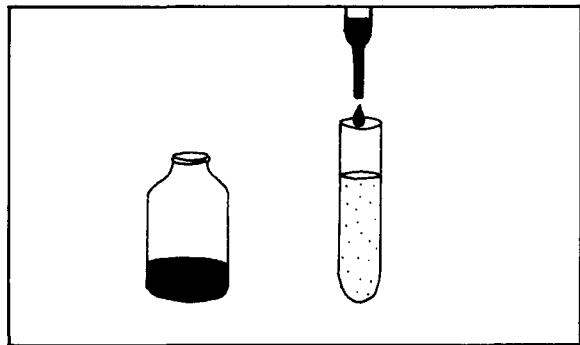
- Sérum du malade (voir page 437)
- Hématies du malade
- Hématies du donneur provenant du flacon pilote
- Soluté physiologique (réactif No. 47)
- Albumine bovine à 20% (réactif No. 7)
- Bain-marie ou incubateur à 37°C
- Centrifugeur
- Pipettes
- Tubes à essai — petits et moyens.



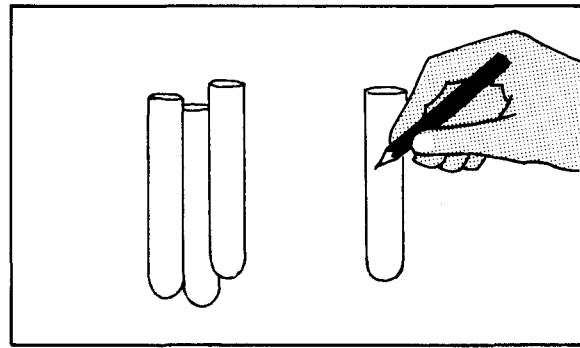
MÉTHODE HABITUELLE

Choisir le sang du donneur à comparer au sang du malade compte tenu du groupe sanguin du malade (voir page 436).

1. Préparer une suspension (2 à 5%) d'hématies lavées du donneur:
 - inscrire le groupe sanguin et le nom du donneur sur un tube à essai de taille moyenne
 - verser dans le tube environ 4 ml de soluté physiologique
 - y ajouter 3 gouttes d'hématies du donneur
 - mélanger
 - laver 3 fois comme il est dit page 440.



2. Prendre 4 petits tubes à essai et les marquer de 1 à 4:
 - tube 1 —soluté physiologique contenant les hématies du donneur
 - tube 2 —albumine pour épreuve de compatibilité
 - tube 3 —soluté physiologique pour auto-contrôle
 - tube 4 —albumine pour autocontrôle.



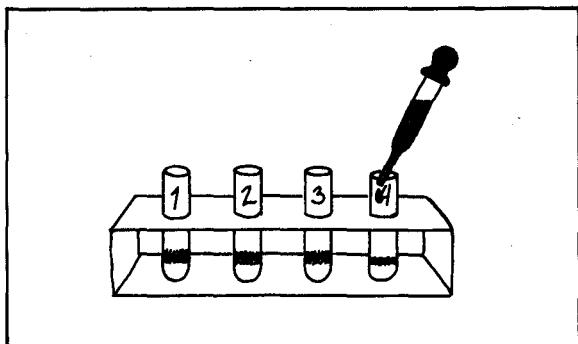
3. A l'aide d'une pipette, verser dans les tubes:

tubes 1 et 2:

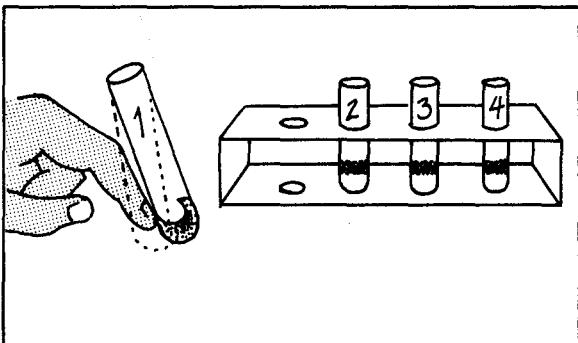
- 2 gouttes de sérum du malade
- 2 gouttes de suspension à 2 à 5% des hématies lavées du donneur

tubes 3 et 4:

- 2 gouttes de sérum du malade
- 2 gouttes de suspension à 2 à 5% des hématies lavées du malade.

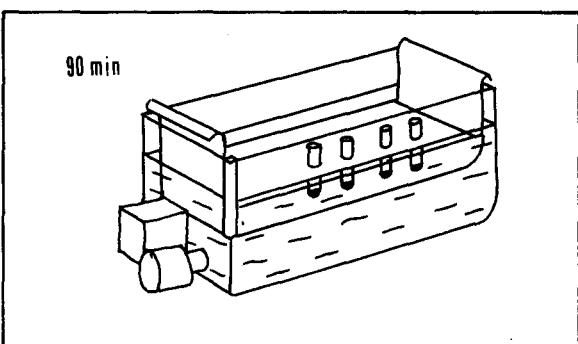


4. Mélanger les hématies et le sérum en tapotant doucement le fond de chaque tube.



5. Mettre les tubes dans un bain-marie ou un incubateur à 37°C.

Attendre 1 heure et demie.

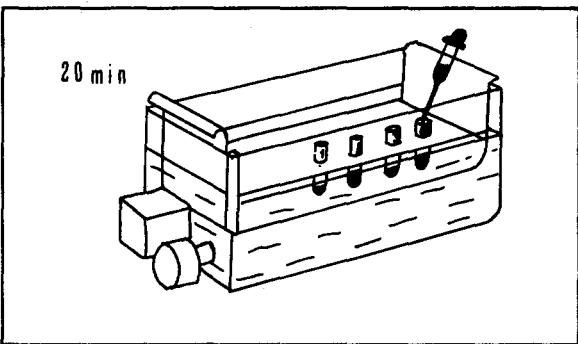


6. Ajouter 2 gouttes de solution d'albumine bovine à 20%:

- au tube 2
- au tube 4.

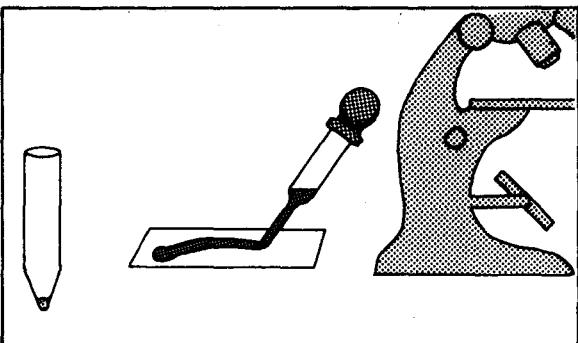
Ne pas mélanger.

Laisser incuber encore 20 à 30 minutes.



7. Examiner au microscope le culot des hématies de chaque tube:

- utiliser une pipette Pasteur (au bout intact)
- aspirer soigneusement le culot en prenant garde de ne pas trop l'agiter
- l'étaler sur une lame propre
- l'examiner au microscope à l'objectif 10 x pour voir si l'agglutination s'est produite.



RÉSULTATS

<i>Pas d'agglutination</i>	Les sangs sont compatibles et la transfusion est sans danger.
<i>Forte agglutination ou hémolyse dans le tube 1, agglutination plus faible dans le tube 2</i>	Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. On a probablement utilisé un groupe ABO qui ne convient pas. Vérifier à nouveau les groupes sanguins du malade et du donneur.
<i>Agglutination uniquement dans le tube 1</i>	Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. Le malade a ce que l'on appelle des anticorps complets. Il se peut que l'on trouve un sang compatible avec le sien en faisant appel à un autre donneur, mais il faut, dans toute la mesure possible, solliciter l'avis d'un service spécialisé.
<i>Agglutination uniquement dans le tube 2</i>	Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. Le malade a probablement des anticorps, anti-D, par exemple, s'il est Rh négatif et que l'on a eu recours à du sang Rh positif.
<i>Agglutination dans les quatre tubes</i>	Le sérum du malade contient des auto-anticorps. Solliciter l'avis d'un service spécialisé, et, si possible, lui demander d'effectuer une épreuve de compatibilité.
<i>Rouleaux</i>	La présence de rouleaux importants peut être délicate à distinguer d'une véritable agglutination. La formation de rouleaux est souvent moins marquée dans les tubes d'albumine. Si l'on ajoute du soluté physiologique à la suspension d'hématies, sur la lame, les rouleaux pourront être suffisamment dispersés pour que la distinction soit possible (voir page 442).

CAS D'URGENCE

En cas d'urgence, il se peut que l'on ne puisse laisser incuber les tubes assez longtemps. Si l'on dispose de moins de 45 minutes, examiner le tube 1:

- centrifuger le tube 1 pendant 1 minute, à vitesse réduite.
- examiner le culot de centrifugation au microscope.

S'il n'y a pas d'agglutination, transmettre le flacon à la personne chargée de la transfusion après avoir noté clairement sur l'étiquette "Sang compatible d'après épreuve d'urgence". Toujoursachever l'épreuve de compatibilité par la méthode habituelle.

42. Dépistage des donneurs O dangereux

Intérêt

En cas d'urgence, on peut être amené à transfuser du sang O à un malade A, B ou AB. Chez certains sujets O, le plasma contient d'importantes quantités d'anticorps anti-A et, plus rarement, anti-B, qui pourront réagir avec les hématies A, B ou AB du malade. Il convient donc de dépister ces sujets O, pour s'assurer qu'ils ne peuvent pas être considérés comme des "donneurs universels".

Le sang qui contient des quantités anormalement élevées d'anticorps anti-A et anti-B doit être réservé aux seuls sujets du groupe O.

Principe

Le sérum frais du donneur est mis à incuber avec une très petite quantité d'hématies A₁ et B. S'il y a trop d'anticorps anti-A et anti-B, ces hématies sont hémolysées et le sérum se colore en rose.

MÉTHODE

Préparer:

- une suspension à 5% d'hématies A₁ dans du soluté physiologique
- une suspension à 5% d'hématies B dans du soluté physiologique.

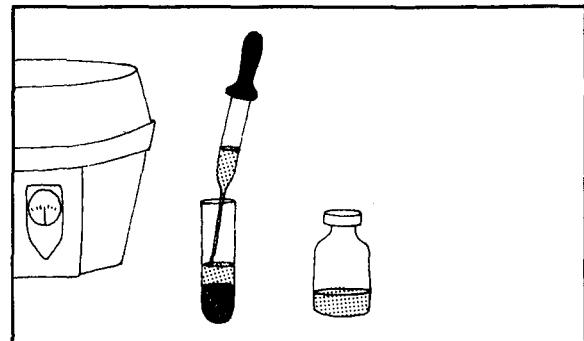
(Procéder comme indiqué pour la préparation des hématies-tests, page 443).

2 lavages successifs sont nécessaires.

1. Séparer le sérum du donneur (dans le tube sans anticoagulant).

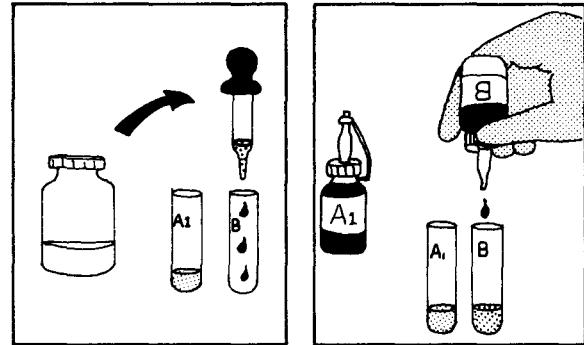
L'épreuve doit être faite *dans les 6 heures* suivant le prélèvement*.

* Passé ce délai, ajouter un volume égal de sérum frais de sujet AB.

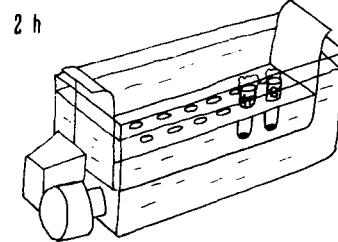


2. Déposer dans 2 tubes:

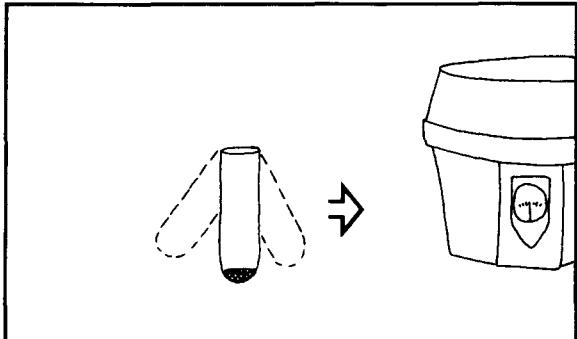
	Tube A ₁	Tube B
sérum frais du donneur	9 gouttes	9 gouttes
hématies A ₁ à 5%	1 goutte	—
hématies B à 5%	—	1 goutte



3. Laisser les tubes:
— 2 heures à 37°C (incubateur ou bain-marie).



4. Tapoter légèrement les tubes pour remettre les hématies en suspension.
Centrifuger pendant 1 minute à vitesse réduite.



Examiner la coloration du sérum surnageant.

RÉSULTATS

1. Coloration jaune:

Il reste un culot d'hématies.
Ce donneur O peut être considéré comme donneur universel.

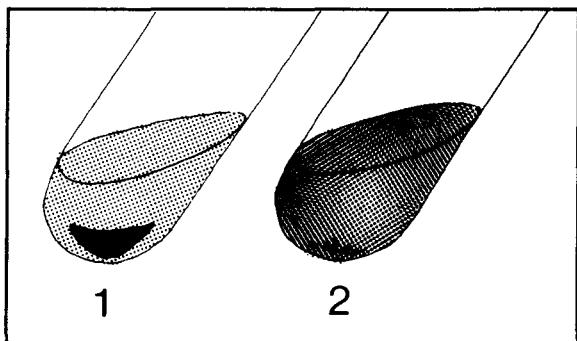
2. Coloration rosée:

Toutes les hématies ou la plupart d'entre elles ont été hémolysées, et il ne reste qu'un culot réduit d'hématies.

Le sang de ce donneur O ne peut être utilisé que pour des transfusions à des sujets O.

Inscrire alors sur l'étiquette du flacon de sang:

DONNEUR "O" DANGEREUX
N'UTILISER QUE POUR MALADES
DU GROUPE "O"



43. Prélèvement et conservation du sang

Le sang utilisé pour les transfusions doit être prélevé et conservé correctement pour éviter tout risque d'accident.

DONNEURS DE SANG

Conditions requises:

- adultes en bonne santé, entre 18 et 50 ans
- taux d'hémoglobine supérieur à 125 g/l ou hémoglobine (Fe) supérieure à 7,8 mmol/l.

Une femme enceinte ne doit pas donner son sang.

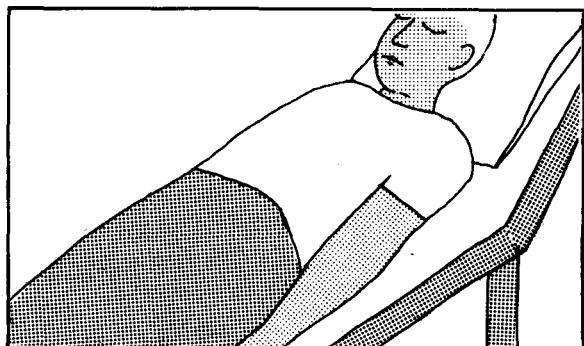
On peut donner du sang tous les 4 à 6 mois.

Procéder au groupage des donneurs par la méthode du groupage sur lame (voir pages 437 et 443).

PRÉLÈVEMENT

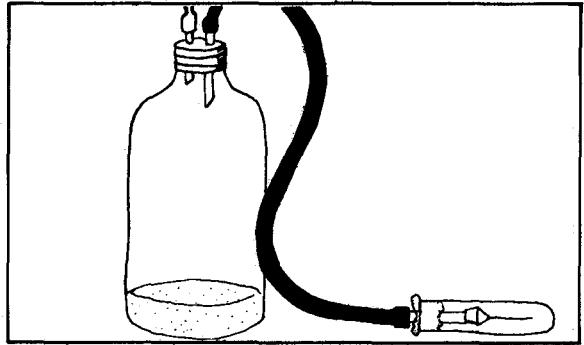
Matériel

- Coton hydrophile et alcool
- Manchon de sphygmomanomètre
- Flacon pour échantillon de sang (ou sac en plastique)
- Canule
- Nécessaire pour prélèvement sanguin, avec 120 ml de solution ACD
- Objet à faire serrer au donneur
- Pince
- Ciseaux
- Ruban adhésif
- Flacon pilote contenant 1 ml de solution ACD (réactif No. 1; voir page 444) attaché au flacon de prélèvement
- Tube de sérum si le sang est du groupe O.



Méthode

1. Faire étendre le donneur sur un lit et placer un oreiller sous sa tête.

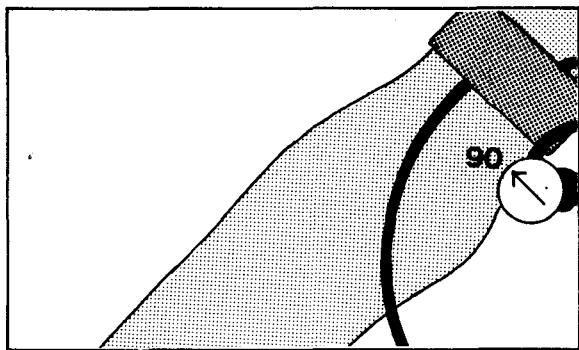


2. Préparer le flacon de prélèvement en suivant, le cas échéant, les instructions du fournisseur. Si le flacon est en verre et n'est pas sous vide:
— nettoyer le goulot à l'alcool
— insérer une canule pour assurer la sortie de l'air
— insérer l'aiguille du nécessaire pour prélèvement sanguin en s'assurant qu'elle est placée plus bas que la canule.

Si l'aiguille et la canule sont toutes les deux au même niveau, le sang peut passer dans la canule et la bloquer.

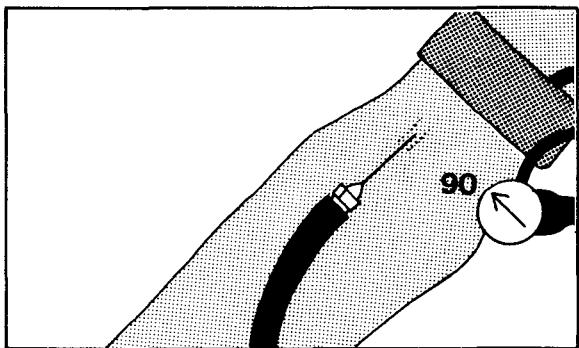
3. Placer le manchon du sphygmomanomètre autour du bras du donneur, au-dessus du coude.

Porter la pression à 8-100 mmHg (11 à 13,5 kPa) et trouver la veine. (Pour la ponction veineuse, voir page 353.)

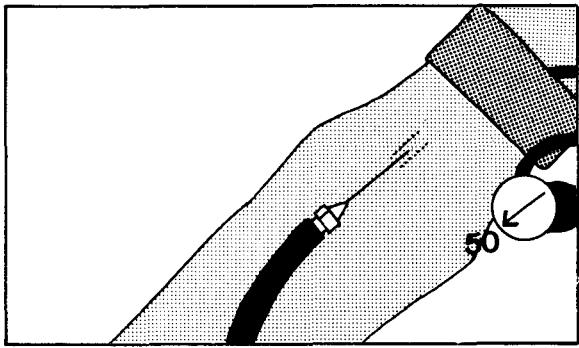


4. Bien nettoyer à l'alcool à 70° la région autour de la veine, à l'aide d'un tampon de coton.

Faire pénétrer l'aiguille dans le sens de la veine.



5. Quand le sang commence à couler dans le flacon, réduire la pression à 40-60 mmHg (5,5 à 8 kPa) et agiter lentement le flacon pour mélanger le sang à l'anticoagulant.



6. Demander au donneur de fermer le poing en serrant un petit objet, pour aider le sang à s'écouler.

Si le flux sanguin se ralentit:

- augmenter la pression à 80 mmHg environ (11 kPa).

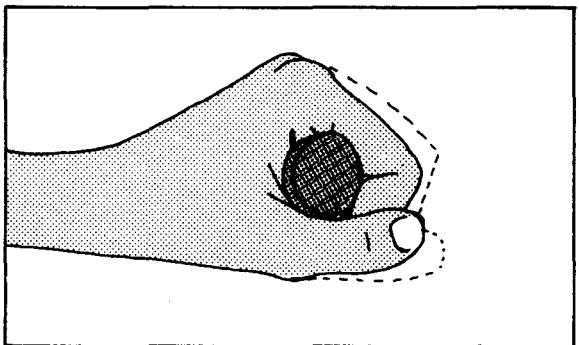
Si le sang ne coule pas mieux:

- insérer dans le flacon une 2ème canule.

Si l'écoulement ne s'améliore pas:

- essayer délicatement et soigneusement de modifier la position de l'aiguille dans la veine.

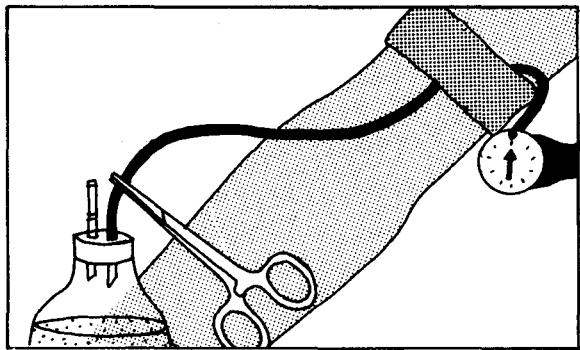
Si l'aiguille sort de la veine et qu'il se forme un petit hématome dû à une hémorragie sous-cutanée, réduire la pression, retirer l'aiguille et presser fermement avec un tampon de coton jusqu'à ce que le sang ne coule plus.



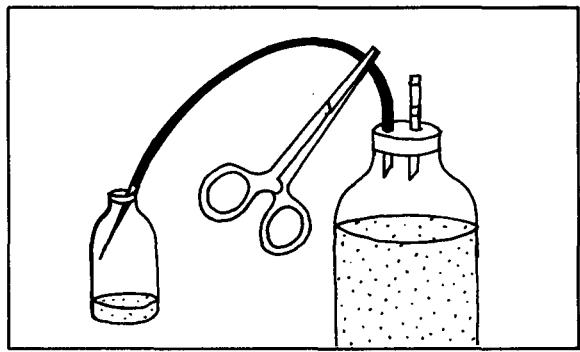
Attention:

Si le sang ne s'écoule plus, *ne jamais réduire la pression* sans avoir au préalable inséré une 2ème canule dans le flacon. Le flux de sang peut avoir stoppé parce que la 1ère est bloquée, ce qui augmente la pression d'air dans le flacon. Si la pression diminue, l'air s'échappera du flacon, pénétrera dans le tuyau et dans la veine du donneur, ce qui peut causer une embolie qui risquerait d'être fatale.

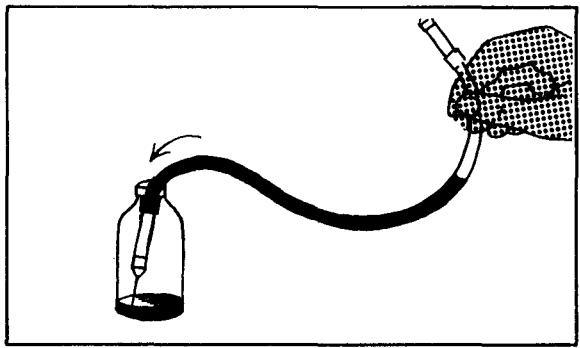
-
7. Quand le sang atteint la marque (généralement 540 ml) (120 ml d'anticoagulant ACD et 420 ml de sang):
— réduire la pression
— couper le tuyau près de l'orifice du flacon
— retirer l'objet de la main du donneur.



8. Retirer le manchon. Retirer l'aiguille en appuyant sur le point de piqûre à l'aide d'un tampon de coton.
Placer l'aiguille dans le flacon pilote.

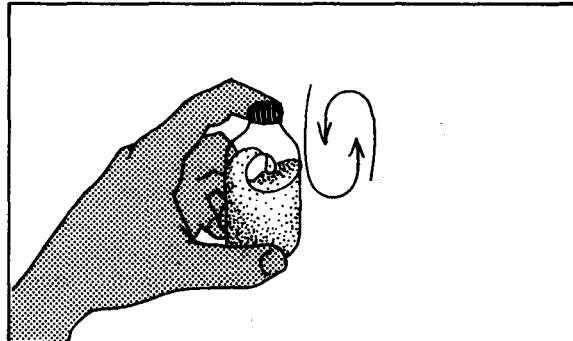


9. Retirer l'aiguille du flacon de sang:
— retirer la pince
— laisser le sang s'écouler dans le flacon pilote.
Si le sang est du groupe O, en placer un peu également dans un tube vide. Le sérum servira à l'épreuve d'hémolyse (voir page 456).

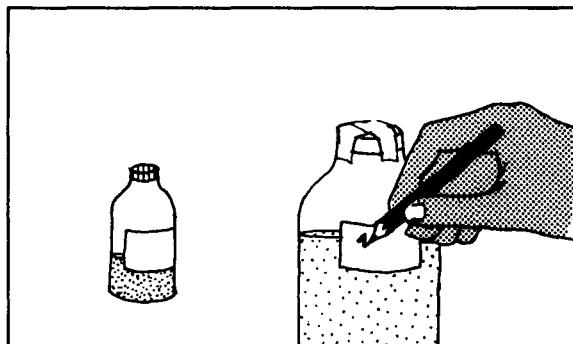


10. Retirer la canule du flacon de prélèvement. Couvrir le flacon d'une capsule de plastique ou d'adhésif.

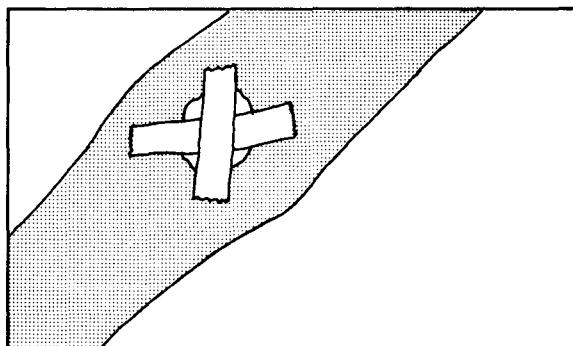
11. Retirer l'aiguille du flacon pilote et le boucher.
Mélanger le sang et l'anticoagulant en retournant le flacon pilote à plusieurs reprises.



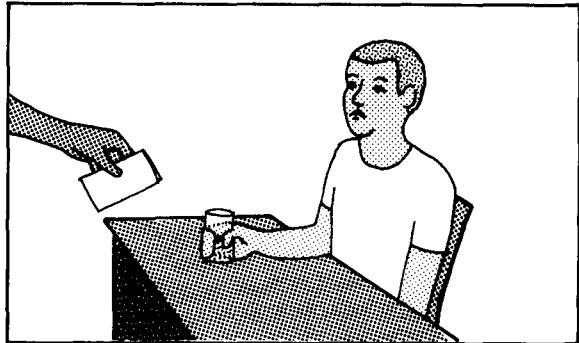
12. Marquer soigneusement sur le flacon pilote et sur le flacon de sang:
— le groupe ABO et le facteur Rh
— le numéro et le nom du donneur
— le délai d'utilisation (3 semaines à partir de la date de prélèvement).



13. S'assurer que le donneur ne saigne plus.
Couvrir le point de piqûre d'un pansement.



14. Donner à boire au donneur (du jus de fruit est tout indiqué — mais pas de boisson alcoolisée).
Remettre au donneur un certificat de donneur de sang, fourni par le service de transfusion sanguine.
Tenir un registre des donneurs de sang où l'on consignera le nom du donneur, son groupe sanguin, son taux d'hémoglobine, son numéro et la date du prélèvement.



CONSERVATION DU SANG

Le sang peut être conservé pendant 3 semaines au réfrigérateur, compte tenu de certaines conditions:

- La température doit être entre 4 et 6°C — ce qui suppose un réfrigérateur à thermostat, de préférence à compression. On peut aussi utiliser un modèle à absorption, fonctionnant au gaz ou à l'électricité, pourvu qu'on ne doive pas l'ouvrir trop souvent.
- Le sang conservé à 8 ou 10°C ne peut être conservé au-delà de quelques jours.
- Le sang ne doit pas être stocké avec des vaccins, des réactifs ou des médicaments qui obligent à ouvrir fréquemment le réfrigérateur.
- Il faut enregistrer chaque jour la température à l'aide d'un thermomètre trempant dans une bouteille d'eau placée dans le réfrigérateur. L'idéal serait que le réfrigérateur servant de banque de sang soit doté d'un thermomètre enregistreur.
- On consignera par écrit le détail de tous les flacons de sang utilisés ou conservés au réfrigérateur.

CONTRÔLE DU SANG DES DONNEURS

Certaines maladies peuvent être transmises par le sang, aussi peut-on être amené à soumettre le sang des donneurs à différents contrôles:

- Des parasites du paludisme peuvent être découverts dans le sang, notamment dans les zones d'endémicité. Il est généralement préférable de prescrire de la chloroquine aux malades qui reçoivent des transfusions dans ces régions, plutôt que d'éliminer du sang impaludé. Une température de 4 à 6°C ne suffit pas pour tuer ces parasites.
- *Treponema pallidum*, l'agent de la syphilis, peut rester viable dans le sang jusqu'à 48 heures. Si par conséquent le sang est conservé plus de 2 jours, le tréponème ne peut plus être transmis. Effectuer chaque fois que possible l'épreuve du VDRL.
- Dans les zones où une forme de trypanosomiase (africaine ou américaine) est endémique, rechercher les trypanosomes dans des gouttes épaisses de sang ayant subi une coloration de Romanowsky. *T. cruzi* exige également des épreuves sérologiques, car on trouve peu d'organismes dans le sang. Pour la trypanosomiase africaine, en plus de l'examen d'une goutte épaisse, on peut utilement vérifier la vitesse de sédimentation érythrocytaire.
- *Leishmania donovani*, qui est responsable du kala-azar, doit être recherchée dans les zones où la maladie est endémique, par une épreuve de dépistage au formol* pratiquée sur sérum. Si l'épreuve est positive, ne pas utiliser le sang.
- Les microfilaires pathogènes peuvent provoquer des réactions allergiques, mais non transmettre la filariose.
- L'hépatite virale peut être transmise par transfusion sanguine. Chaque fois que l'on dispose des installations voulues, il est conseillé d'effectuer l'épreuve à l'antigène Australia.

*Méthode: Ajouter une goutte de formol à 40% (du commerce) à 1 ml de sérum. Si l'épreuve est positive, la coagulation totale s'opère en quelques secondes (le sérum est figé quand on renverse le tube). Le mélange devient trouble en 20 minutes. Au stade précoce de la maladie, la réaction peut être lente.

44. Sang : groupage et épreuve de compatibilité. Plan de travail.

GROUPAGES SANGUINS

Méthode sur lame ou sur plaque

1. Préparer une suspension d'hématies du malade dans du soluté physiologique (réactif No. 47). (Pour le facteur Rhésus la préparer dans du sérum.)
2. Prendre des plaques, les marquer et verser dessus à la pipette:

Anti-A	Anti-B	Anti-AB
— 1 goutte de sérum anti-A	— 1 goutte de sérum anti-B	— 1 goutte de sérum anti-AB
— 1 goutte d'hématies du malade	— 1 goutte d'hématies du malade	— 1 goutte d'hématies du malade

Hématies A ₁	Hématies B	Hématies O
— 1 goutte d'hématies A ₁	— 1 goutte d'hématies B	— 1 goutte d'hématies O
— 1 goutte de sérum du malade	— 1 goutte de sérum du malade	— 1 goutte de sérum du malade

Anti-D

- | |
|---|
| — 1 goutte de sérum anti-D |
| — 1 goutte d'hématies du malade en suspension sérique |

3. Mélanger.
4. Réchauffer la plaque anti-D sur un Rhésuscope.
5. Lire les résultats:

Groupe	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Hématies A ₁	Hématies B	Hématies O	Anti-D
A Pos	+	—	+	—	+	—	+
B Pos	—	+	+	+	—	—	+
AB Pos	+	+	+	—	—	—	+
O Pos	—	—	—	+	+	—	+

6. Incrire tous les résultats dans le registre des groupages sanguins.

Méthode du tube à essai

1. Préparer une suspension d'hématies du malade dans une solution de chlorure de sodium à 2-5%. (Pour le facteur Rhésus la préparer dans du sérum.)
2. Prendre sept tubes, les marquer et les remplir comme suit à la pipette:

1
1 goutte de sérum anti-A
1 goutte d'hématies du malade

2
1 goutte de sérum anti-B
1 goutte d'hématies du malade

3
1 goutte de sérum anti-AB
1 goutte d'hématies du malade

4
2 gouttes de sérum du malade
1 goutte d'hématies A₁

5
2 gouttes de sérum du malade
1 goutte d'hématies B

6
2 gouttes de sérum du malade
1 goutte d'hématies O

7
1 goutte de sérum anti-D
1 goutte d'hématies du malade (suspension sérique)

3. Mélanger.
4. Laisser incuber le tube d'anti-D à 37°C.
5. Laisser reposer tous les tubes pendant deux heures.
6. Lire les résultats, et vérifier au microscope tous les résultats négatifs.

ÉPREUVE DE COMPATIBILITÉ

Epreuve ordinaire

1. Préparer une suspension d'hématies du donneur et du malade dans une solution de chlorure de sodium à 2%.
2. Prendre quatre tubes, les marquer et les remplir comme suit à la pipette:

1 *Albumine (compat. avec donneur)*
2 gouttes du sérum
du malade
1 goutte d'hématies
du donneur

2 *Albumine (autocontrôle)*
2 gouttes du sérum
du malade
1 goutte d'hématies
du malade

3 *Solution chl. de sod.
(compat. avec donneur)*
2 gouttes du sérum
du malade
1 goutte d'hématies
du donneur

4 *Sol. chl. sod.
(autocontrôle)*
2 gouttes du sérum
du malade
1 goutte d'hématies
du malade

3. Mélanger.
4. Laisser incuber les tubes pendant une heure à 37°C.
5. Ajouter aux tubes 2 et 4 deux gouttes d'albumine bovine à 20%. NE PAS MÉLANGER.
6. Laisser reposer encore 20 minutes à 37°C.
7. Examiner au microscope le culot globulaire de chaque tube.

S'il n'y a pas agglutination, les sanguins sont compatibles. Transmettre le flacon de sang avec l'étiquette certifiant que l'épreuve de compatibilité est satisfaisante.

S'il y a agglutination, voir l'interprétation des résultats page 455.
Noter tous les résultats dans le registre des transfusions sanguines.

Cas d'urgence

1. Comme pour l'épreuve ordinaire de compatibilité.
2. Comme pour l'épreuve ordinaire de compatibilité.
3. Comme pour l'épreuve ordinaire de compatibilité.
4. Laisser incuber tous les tubes à 37°C pendant aussi longtemps que possible.

Si l'on dispose de moins de 45 minutes:

— centrifuger le tube 1 pendant une minute à vitesse réduite.

5. Examiner au microscope le culot globulaire du tube 1.

S'il n'y a pas agglutination, transmettre le flacon avec une étiquette indiquant que l'épreuve de compatibilité pour cas d'urgence a donné un résultat satisfaisant.

Attention:

Compléter l'épreuve de compatibilité en suivant les étapes 5 à 7 comme il est dit page 454. Si l'on constate une agglutination, en informer immédiatement le médecin.

LES RÉACTIFS ET LEUR PRÉPARATION

Classement

Les réactifs sont classés par ordre alphabétique, étant entendu que des mots tels que "solution de", "réactif de" ou "mélange" n'entrent pas en ligne de compte pour ce classement.

Ainsi, pour:

acide acétique	chercher sous	A
bleu de créosyl	chercher sous	B
solution de carbonate de sodium.	chercher sous	C
réactif de Pandy	chercher sous	P
violet de gentiane	chercher sous	V

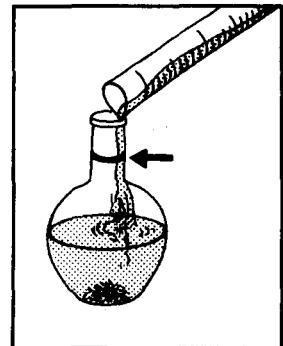
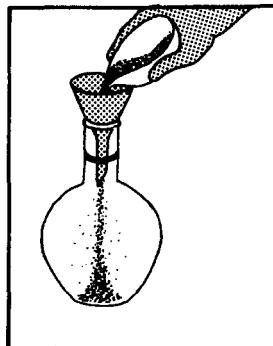
Le nom du réactif est suivi par son numéro d'ordre de classement (celui qui est indiqué dans le corps du texte).

q.s.p. = "en quantité suffisante pour faire"

Par exemple: chlorure de sodium 8,5 g
eau distillée q.s. 1000 ml

signifie:

Mettre 8,5 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée ou une éprouvette. Ajouter suffisamment d'eau (q.s.p.) pour obtenir un volume total de 1000 ml.



Formules chimiques

Dans la plupart des cas, les formules chimiques des composés à utiliser sont indiquées immédiatement après leur dénomination française:

- chlorure de sodium (NaCl)
- potasse (KOH)
- acide sulfurique (H_2SO_4)
- etc.

Cela peut être utile pour le contrôle de certaines étiquettes.

Solution aqueuse = solution "eau + composé".

ACD – SOLUTION (No. 1)*

Glucose	2,45 g
Citrate trisodique	2,20 g
Acide citrique	0,89 g
Eau distillée	100 ml

*Formule USP, c'est-à-dire de la pharmacopée des Etats-Unis.

ACIDE – RÉACTIF (No. 2)

Acide sulfurique concentré	40 ml
Acide orthophosphorique à 85%	5 ml
Solution de chlorure ferrique à 5%	5 ml
Eau distillée	q.s.p. 500 ml

Remplir à moitié d'eau un flacon de 500 ml, ajouter très lentement l'acide sulfurique en remuant constamment, puis l'acide phosphorique. Ajouter la solution de chlorure ferrique et remplir d'eau jusqu'à la marque 500 ml.
Conserver dans un flacon en verre brun.

Attention: L'acide sulfurique est extrêmement corrosif.

ACIDE ACÉTIQUE à 10% (No. 3)

Acide acétique glacial (CH_3COOH)	20 ml
Eau distillée	q.s.p. 200 ml

Attention: L'acide acétique glacial est extrêmement corrosif.

ACIDE BENZOÏQUE – voir GLUCOSE (No. 32)

ACIDE CHLORHYDRIQUE – 0,1 mol/l (No. 4)

Acide chlorhydrique (HCl), concentré	8,6 ml
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Mesurer 500 ml d'eau. Ajouter l'acide, goutte à goutte. Compléter avec le reste de l'eau jusqu'à 1 litre. La solution ainsi obtenue ne peut être utilisée que pour l'estimation de l'hémoglobine par la méthode de Sahli. La renouveler chaque mois.

Attention: L'acide chlorhydrique est extrêmement corrosif.

ACIDE SULFOSALICYLIQUE – SOLUTION à 3% (No. 5)

Pour le dosage des protéines à l'aide de protéines étalons:

– diluer la solution aqueuse à 30% (réactif No. 6, voir ci-dessous) dans les

proportions suivantes:

- acide sulfosalicylique à 30% 50 ml
- eau distillée 450 ml

ACIDE SULFOSALICYLIQUE – SOLUTION à 30% (No. 6)

Acide sulfosalicylique	30 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

ACIDE TRICHLORACÉTIQUE – voir GLUCOSE (No. 32)

ACIDE TRICHLORACÉTIQUE à 10% – voir URÉE (No. 54)

ALBUMINE BOVINE à 20% (No. 7)

Pour transfusions sanguines.

Préparer une solution à partir d'albumine bovine à 30% que l'on peut se procurer dans le commerce.

Albumine bovine à 30%	10 ml
Eau distillée stérile	5 ml

Il existe aussi une solution à 22%. Elle peut être utilisée sans autre dilution et est recommandée par certains auteurs.

ALCOOL ACIDE pour coloration de Ziehl-Neelsen (No. 8)

Acide chlorhydrique, concentré	3 ml
Alcool à 95°	97 ml

Attention: L'acide chlorhydrique est extrêmement corrosif.

BÉNÉDICT – SOLUTION DE (No. 9)

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	17,3 g
Citrate trisodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	173,0 g
Carbonate de sodium (Na_2CO_3), anhydre	100,0 g
Eau distillée	1000 ml

Dissoudre les cristaux de sulfate de cuivre à la chaleur dans 100 ml d'eau distillée. Par ailleurs, dissoudre le citrate trisodique et le carbonate de sodium dans 800 ml d'eau. Ajouter lentement la solution de sulfate de cuivre à la solution de carbonate de sodium et de citrate trisodique en remuant constamment. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 ml.

"BLANK REAGENT" – RÉACTIF NEUTRE (No. 10)

Solution d'acide trichloracétique à 10%	50 ml
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Mélanger.

Attention: L'acide trichloracétique est extrêmement corrosif.

BLEU DE CRÉSYL – SOLUTION (No. 11)

Bleu de crésylic brillant	1,0 g
Citrate trisodique	0,4 g
Solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85%	100 ml

(réactif No. 24)
Mélanger le colorant et le citrate dans la solution. Filtrer après dissolution.

BLEU DE MÉTHYLÈNE AQUEUX (No. 12)

Bleu de méthylène	0,3 g
Eau distillée	100 ml

Filtrer après dissolution.

CARBONATE DE SODIUM – SOLUTION AQUEUSE à 5% (No. 13)

Carbonate de sodium (Na_2CO_3) anhydre (ou quantité équivalente de l'un de ses hydrates)	5 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

CARY-BLAIR – MILIEU DE TRANSPORT (No. 14)

Thioglycolate de sodium	1,5 g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4), anhydre	1,1 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar agar	5,0 g
Eau distillée	991,0 ml

1. Préparer si possible dans un récipient en verre chimiquement propre.
2. Faire chauffer tout en mélangeant jusqu'à ce que la solution soit claire.
3. Laisser refroidir jusqu'à 50°C, ajouter 9 ml de solution aqueuse de chlorure de calcium à 1% fraîchement préparée et porter le pH à environ 8,4.
4. Verser 7 ml dans des flacons de 9 ml, dont les bouchons se vissent, après les avoir rincés et stérilisés.
5. Exposer les flacons remplis pendant 15 minutes à la vapeur, laisser refroidir et visser les bouchons à fond.

CHLORURE DE BARYUM – SOLUTION AQUEUSE à 10% (No. 15)

Chlorure de baryum (BaCl_2)	10 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

CHLORURE DE SODIUM – SOLUTION à 0,85% – voir SOLUTÉ PHYSIOLOGIQUE (No. 47)

CITRATE DE SODIUM – SOLUTION – voir CITRATE TRISODIQUE (No. 16)

Citrate trisodique	2 g
Soluté physiologique (No. 47)	q.s.p. 100 ml
Conserver au réfrigérateur.	

CITRATE TRISODIQUE – SOLUTION à 3,8% (No. 17)

Citrate trisodique, anhydre (ou quantité équivalente du dihydrate ou du pentahydrate)	3,8 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml
Conserver au réfrigérateur. Utiliser 1 ml de solution pour 4 ml de sang.	

CITRATE TRISODIQUE – SOLUTION à 5% – voir URÉE (No. 54)

DIACÉTYLE-MONOXIME – voir URÉE (No. 54)

DRABKIN – DILUANT DE (No. 18)

Le diluant de Drabkin peut être préparé à partir de comprimés que l'on peut se procurer directement auprès du fabricant. Suivre les instructions données par celui-ci.

Pour les laboratoires dotés d'une balance précise, le diluant de Drabkin peut être préparé comme suit:

Ferricyanure de potassium	0,4 g
Cyanure de potassium	0,1 g
Phosphate monopotassique	0,28 g
Nonidet P40 (Shell Chemical Co)	2 ml
(ou Sterox SE)	(1 ml)
Eau distillée	q.s.p. 2000 ml

Dissoudre les 3 premiers produits dans l'eau et mélanger.

Ajouter le détergent (Nonidet ou Sterox) et mélanger délicatement.

Le réactif doit être clair et jaune pâle.

Lorsqu'on le mesure par rapport à l'eau dans un spectrophotomètre, à une longueur d'ondes de 540 nm, la densité optique doit être égale à 0.

Conserver dans un flacon en verre brun. Ne pas utiliser le réactif s'il est trouble.

Attention: Le cyanure de potassium est un produit extrêmement毒ique qui ne doit être utilisé que par des chimistes expérimentés. Le conserver dans un placard fermé à clé. Après l'avoir utilisé, se laver soigneusement les mains.

EAU GLYCÉRINÉE (No. 19)

Glycérine pure	5 ml
Eau distillée (ou filtrée et bouillie)	q.s.p. 1000 ml

EAU PHYSIOLOGIQUE – voir SOLUTÉ PHYSIOLOGIQUE (No. 47)**EAU TAMPONNÉE (No. 20)**

Solution tampon pour colorants de May-Grünwald, Giemsa et Leishman.

Phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,76 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	2,1 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Contrôler le pH à l'aide de papiers indicateurs, gamme étroite, ou avec un comparateur, comme indiqué page 61. Il doit être de 7,0 à 7,2.

EDTA – SOLUTION à 10% DE SEL DIPOTASSIQUE DE L'ACIDE (No. 21)

Sel dipotassique de l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) . . .	20 g
Eau distillée	q.s.p. 200 ml

Transvaser à la pipette 0,04 ml de cette solution dans de petits récipients destinés à contenir 2,5 ml de sang. Laisser sécher l'anticoagulant en plaçant les récipients pendant une nuit sur un plan de travail chaud ou dans un incubateur à 37°C.

EHRLICH – RÉACTIF DE (No. 22)

Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	2 g
Acide chlorhydrique concentré (HCl)	20 ml
Eau distillée	80 ml

Mélanger le premier produit à l'eau, puis ajouter soigneusement l'acide. Bien mélanger.

Attention: L'acide chlorhydrique est extrêmement corrosif.

ÉOSINE – SOLUTION AQUEUSE à 1% (No. 23)

Eosine	1 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

ÉOSINE – SOLUTÉ SALIN à 2% (No. 24)

Eosine	2 g
Soluté physiologique (solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85%)	q.s.p. 100 ml

FIELD – COLORANTS DE (No. 25)**COLORANT DE FIELD – A**

Préparation à partir de poudre toute prête:

Poudre pour colorant de Field A	5,0 g
Eau distillée chaude	q.s.p. 600 ml

Mélanger jusqu'à dissolution. Laisser refroidir, puis filtrer.

Préparation à partir de colorants et de produits chimiques:

Bleu de méthylène (médicinal)	1,6 g
Azur 1	1,0 g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4), anhydre	10,0 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	12,5 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Dissoudre les deux phosphates dans l'eau. Verser environ la moitié de la solution phosphatée dans un flacon de 1 litre contenant quelques billes de verre. Ajouter les colorants et bien mélanger. Ajouter le reste de la solution phosphatée. Bien mélanger et filtrer.

COLORANT DE FIELD – B

Préparation à partir de poudre toute prête:

Poudre pour colorant de Field B	4,8 g
Eau distillée chaude	q.s.p. 600 ml

Mélanger jusqu'à dissolution. Laisser refroidir, puis filtrer.

Préparation à partir de colorants et de produits chimiques:

Eosine (jaune, hydrosoluble)	2,0 g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4), anhydre	10,0 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	12,5 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Dissoudre les deux phosphates dans l'eau. Verser dans un flacon d'1 litre.

Ajouter l'éosine. Mélanger jusqu'à dissolution. Filtrer.

FORMOL à 10% (No. 26)

Formol du commerce, à 37% au moins	100 ml
Eau distillée	300 ml

Attention: Le formol est corrosif et toxique.

FORMOL CITRATÉ (No. 27)

Citrate trisodique	3,0 g
Formol du commerce, à 37% au moins	1,0 ml
Eau distillée	100,0 ml

Attention: Le formol est corrosif et toxique.

FORMOL SALIN (No. 28)

Formol neutre, à 37% au moins	10 ml
Soluté physiologique (solution de chlorure de sodium à 0,85% (No. 47)	90 ml

Le formol du commerce est neutralisé par quelques gouttes d'une solution de carbonate de sodium à 5% (réactif No. 13). Contrôler le pH avec un papier indicateur.

Attention: Le formol est corrosif et toxique.

FOUCHET – RÉACTIF DE (No. 29)

1. Préparer une solution de chlorure ferrique à 10%:

Chlorure ferrique (FeCl_3)	10 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

2. Préparation du réactif:

Solution de chlorure ferrique à 10%	10 ml
Acide trichloracétique (CCl_3COOH)	25 g
Eau distillée	100 ml

Dissoudre l'acide dans environ 70 ml d'eau distillée, dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter ensuite les 10 ml de solution de chlorure ferrique à 10%. Compléter avec l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

Attention: L'acide trichloracétique est extrêmement corrosif.

FUCHSINE PHÉNIQUÉE pour coloration de Ziehl-Neelsen (No. 30)

Solution A:

Solution saturée de fuchsine basique

Fuchsine basique	3 g
Alcool à 95°	100 ml

Solution B:

Solution aqueuse de phénol à 5%

Phénol	10 g
Eau distillée	q.s.p. 200 ml

Ensuite:

Solution A	10 ml
Solution B	90 ml

Attention: Cette solution est extrêmement corrosive et toxique.

FUCHSINE PHÉNIQUÉE DE KINYOUN – voir KINYOUN (No. 35)

GIEMSA – COLORANT DE (No. 31)

Colorant de Giemsa en poudre	0,75 g
Méthanol (CH_3OH)	65 ml
Glycérine	35 ml

Mélanger tous les ingrédients dans un flacon contenant des billes de verre et agiter. Remuer trois fois par jour, pendant 4 jours consécutifs. Filtrer. (Consulter la notice d'emploi du fabricant, pour le cas où il indiquerait une dose différente.)

Dans certains pays, la poudre de Giemsa est remplacée par le colorant de Wright (No. 60).

GLUCOSE – RÉACTIFS POUR LE DOSAGE DU (No. 32)

ACIDE BENZOÏQUE à 0,1%

Acide benzoïque	1 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Mesurer 1000 ml d'eau distillée et la chauffer presque jusqu'à ebullition. Ajouter l'acide benzoïque. Dissoudre. Laisser refroidir.

ACIDE TRICHLORACÉTIQUE à 3%

Acide trichloracétique	15 g
Eau distillée	q.s.p. 500 ml

Peser rapidement l'acide, car il est très déliquescents. Le verser dans un bêcher. Ajouter de l'eau pour le dissoudre. Transvaser dans un flacon de 500 ml que l'on remplira d'eau jusqu'à la marque. Se conserve indéfiniment au réfrigérateur.

Attention: L'acide trichloracétique est extrêmement corrosif.

GLUCOSE: SOLUTION-MÈRE DE RÉFÉRENCE

Glucose (dextrose) pur, anhydre	5 g
Solution d'acide benzoïque à 0,1%	q.s.p. 500 ml

Peser très exactement le glucose. Le verser dans une fiole jaugée de 500 ml et remplir de solution d'acide benzoïque jusqu'à la marque. Bien mélanger. Répartir pour congélation en portions d'environ 20 ml. Utiliser un nouveau flacon de solution-mère chaque fois que l'on prépare de la solution dérivée.

GLUCOSE: SOLUTION DÉRIVÉE DE RÉFÉRENCE

Pour 100 mg:

Solution-mère de référence	1,0 ml
Acide benzoïque à 0,1%	q.s.p. 100 ml

Avec la plus grande précision, verser à la pipette 1,0 ml de solution-mère de référence dans une fiole jaugée de 100 ml. Remplir de solution d'acide benzoïque jusqu'à la marque. Bien mélanger. Conserver au réfrigérateur. Renouveler chaque mois.

RÉACTIF à L'ORTHOTOLUIDINE

Thio-urée	0,75 g
Acide acétique glacial	470 ml
Orthotoluidine	30 ml

Dissoudre la thio-urée dans l'acide acétique glacial. (Si cela s'avère difficile, placer le flacon dans un récipient d'eau chaude.) Ajouter l'orthotoluidine et bien mélanger. Conserver dans un flacon de verre brun, à température ambiante.

Attention: Eviter tout contact avec ces produits; l'acide acétique glacial est extrêmement corrosif.

GLYCÉRINÉ -- SOLUTÉ SALIN TAMPONNÉ (No. 33)

Chlorure de sodium	4,2 g
Phosphate dipotassique (K_2HPO_4), anhydre	3,1 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	1,0 g
Rouge de phénol	0,003 g
Eau distillée	700,0 ml
Glycérine	300,0 ml

pH final = 7,2

Répartir en tout petits flacons en ne laissant qu'un espace de 2 cm entre le niveau du soluté et l'orifice du flacon.

GRAM – SOLUTION IODÉE DE (No. 34)

Iode	1 g
Iodure de potassium (KI)	2 g
Eau distillée	300 ml

On peut procéder de 2 manières:

1. Broyer l'iode sec et l'iodure de potassium dans un mortier. Ajouter l'eau, en versant que quelques ml à la fois et broyer à fond à chaque adjonction, jusqu'à dissolution des produits. Verser le reste de l'eau distillée pour bien rincer et transvaser dans un flacon en verre brun.
2. Mesurer 100 ml d'eau distillée dans une éprouvette. Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau. Ajouter l'iode et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau et bien mélanger.
Conserver dans un flacon en verre brun.

KINYOUN – FUCHSINE PHÉNIQUÉE DE (No. 35)

Fuchsine basique	4 g
Phénol	8 g
Alcool à 95%	20 ml
Eau distillée	100 ml

Dissoudre d'abord la fuchsine dans l'alcool, puis ajouter le phénol et l'eau.

Attention: Le phénol est extrêmement corrosif et toxique.

LACTOPHÉNOL – SOLUTION AU BLEU-COTON (No. 36)

Cristaux de phénol	20 mg
Acide lactique	20 ml
Glycérine	40 ml
Eau distillée	20 ml

Mélanger et dissoudre en chauffant légèrement. Ajouter 0,05 g de bleu-coton.

Attention: Le phénol est extrêmement corrosif et toxique.

LEISHMAN – COLORANT DE (No. 37)

Poudre de Leishman	1,5 g
Méthanol	q.s.p. 1000 ml

Rincer un flacon propre au méthanol. Ajouter quelques billes de verre propres. Ajouter la poudre et le méthanol. Bien mélanger pour dissoudre la poudre. Le colorant peut être employé dès le lendemain. Lorsqu'on prépare un colorant de Romanowsky à l'alcool comme le Leishman, il importe de ne laisser pénétrer aucune humidité, ni pendant la préparation, ni pendant le stockage.

LUGOL – SOLUTION DE (No. 38)

Iode	1 g
Iodure de potassium (KI)	2 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

On peut procéder de 2 manières différentes:

1. Peser l'iode dans une capsule de porcelaine ou un verre de montre. Broyer l'iode sec et l'iodure de potassium dans un mortier. Ajouter l'eau, en ne versant que quelques ml à la fois, et broyer à fond à chaque adjonction, jusqu'à dissolution des produits. Verser dans un flacon en verre brun avec le reste de l'eau distillée.
2. Mesurer 100 ml d'eau distillée dans une éprouvette. Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau. Ajouter l'iode et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau et bien mélanger.
Conserver dans un flacon en verre brun.

MAY-GRÜNWALD – COLORANT DE (No. 39)

Poudre de May-Grünwald	5 g
Méthanol	q.s.p. 1000 ml

Rincer un flacon propre au méthanol. Ajouter quelques billes de verre propres. Ajouter la poudre et le méthanol. Bien mélanger pour dissoudre toute la poudre. Le colorant est meilleur si on le conserve pendant 1 à 2 semaines en le mélangeant de temps à autre. Lorsqu'on prépare un colorant de Romanowsky à l'alcool comme le May-Grünwald, il importe de ne laisser pénétrer aucune humidité, ni pendant la préparation ni lors du stockage.

MÉTABISULFITE DE SODIUM – SOLUTION AQUEUSE à 2% (No. 40)

Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	0,5 g
Eau distillée	q.s.p. 25 ml

Préparer avant chaque utilisation.

MIF (No. 41)

1. Préparer la solution-mère:

Teinture de thiomersal à 1:1000 (Merthiolate, Lilly)	200 ml
Formol du commerce (No. 26)	25 ml
Glycérine	5 ml
Eau distillée	250 ml

Conserver en flacon de verre brun pendant 3 mois au maximum.

2. Préparer de la solution de Lugol à 5%:

Iode	5 g
Iodure de potassium (KI)	10 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Préparer comme le Lugol ordinaire (No. 38). Conserver en flacon brun pendant 1 mois au maximum.

3. Le jour-même de l'utilisation, mélanger:

Solution-mère de thiomersal	9,4 ml
Solution de Lugol à 5%	0,6 ml

Attention: Le formol est corrosif et toxique.

NEUTRE, RÉACTIF -- voir BLANK REAGENT (No. 10)**NITRATE D'ARGENT – SOLUTION à 1,7% (No. 42)**

Nitrate d'argent	5,1 g
Eau distillée	q.s.p. 300 ml

Attention: Le nitrate d'argent est un produit caustique.

ORTHOTOLUIDINE – REACTIF À L' – voir GLUCOSE**OXALATE FLUORURÉ – ANTICOAGULANT (No. 43)**

Fluorure de sodium	1,2 g
Oxalate de potassium	6,0 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

A l'aide d'une pipette, verser 0,1 ml d'anticoagulant dans de petits récipients destinés à contenir 2 ml de sang (ou de LCR).

Attention: Le fluorure de sodium et l'oxalate de potassium sont tous deux toxiques.

PANDY – RÉACTIF DE (No. 44)

Phénol	30 g
Eau distillée	500 ml

Placer le phénol dans un flacon de 1000 ml. Ajouter l'eau. Agiter énergiquement. Laisser reposer 1 journée. Vérifier qu'il reste bien du phénol non dissous. Si oui, filtrer. (Si tout le phénol a été dissous, en rajouter 10 g et attendre encore 1 journée avant de filtrer). Le réactif de Pandy est en fait une solution saturée de phénol.

Attention: Le phénol est extrêmement corrosif et toxique.

POTASSE – SOLUTION à 20% (No. 45)

Potasse caustique en granules (KOH)	20 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Attention: La potasse caustique est un produit corrosif.

SAFRANINE -- SOLUTION DE (No. 46)

Solution-mère:

Safranine O (qualité garantie)	2,5 g
Alcool à 95%	q.s.p. 100 ml

Solution dérivée:

Solution-mère	10 ml
Eau distillée	90 ml

SÉQUESTRENÉ – SOLUTION DE – voir EDTA (No. 21)

SOLUTÉ PHYSIOLOGIQUE – SOLUTION à 0,85% (No. 47)

Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

SOLUTÉ SALIN, TAMPONNÉ, GLYCÉRINÉ – voir GLYCÉRINÉ (No. 33)

SOUDE – SOLUTION AQUEUSE à 3% (No. 48)

Soude caustique en granules	3 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Attention: La soude est un produit caustique.

SOUDE – SOLUTION AQUEUSE à 10% (No. 49)

Soude caustique en granules	10 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Attention: La soude est un produit caustique.

STUART – MILIEU DE TRANSPORT (adaptation) (No. 50)

Agar agar	4,00 g
Eau distillée	1,00 l

Chauffer jusqu'à dissolution et ajouter à chaud:

Chlorure de sodium	3,00 g
Chlorure de potassium	0,20 g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4), anhydre	1,15 g
Phosphate monosodique (NaH_2PO_4), anhydre	0,20 g
Thioglycolate de sodium	1,00 g
Chlorure de calcium, solution aqueuse à 1% fraîchement préparée .	10,00 ml
Chlorure de magnésium, solution aqueuse à 1%	10,00 ml

pH final: 7,3

1. Remuer jusqu'à dissolution. Ajouter 10 g de poudre de charbon de bois neutre.
2. Répartir 5 à 6 ml par tube de 13 x 10 mm avec bouchon à visser. Visser les bouchons. (Eviter d'écraser.)
3. Placer pendant 20 minutes dans l'autoclave à 121°C. Renverser les tubes avant solidification pour répartir uniformément le charbon de bois. Conserver au réfrigérateur.

SULFO-CHROMIQUE – MÉLANGE (No. 51)

Pour le nettoyage de la verrerie.

Bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	100 g
Eau	1000 ml
Acide sulfurique pur (H_2SO_4)	100 ml

Dissoudre le bichromate dans l'eau. Ajouter l'acide peu à peu, très soigneusement, en remuant constamment. Toujours verser l'acide dans l'eau et NON l'eau sur l'acide. Si l'on dispose de détergents du commerce tels que Teepol 053, Labrite ou Extran, on n'a généralement pas besoin de mélange sulfo-chromique.

Attention: Le bichromate de potassium et l'acide sulfurique sont également corrosifs et le mélange l'est encore davantage; ne l'utiliser que si c'est vraiment nécessaire.

THIOSEMICARBAZIDE – SOLUTION-MÈRE – voir URÉE (No. 54)

THIOSULFATE DE SODIUM – SOLUTION AQUEUSE à 3% (No. 52)

Thiosulfate de sodium, anhydre (ou quantité équivalente de Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O)	3 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Conserver dans un flacon compte-gouttes en verre brun. Sert à neutraliser le chlore dans les prélevements d'échantillons d'eau destinés à des examens bactériologiques.

TÜRK – SOLUTION DE (No. 53)

Acide acétique glacial (CH ₃ COOH)	4 ml
Eau distillée	q.s.p. 200 ml
Solution aqueuse de bleu de méthylène	10 gouttes

Préparer une solution de bleu de méthylène en dissolvant 0,3 g de bleu de méthylène dans 100 ml d'eau distillée. Filtrer avant d'ajouter à la solution acide.

Attention: L'acide acétique est corrosif.

URÉE – REACTIFS POUR LE DOSAGE DE L' – (No. 54)

ACIDE TRICHLORACÉTIQUE à 10%

Acide trichloracétique	20 g
Eau distillée	q.s.p. 200 ml

Peser rapidement l'acide, car il est très délicquescent. Transférer dans un bêcher. Ajouter de l'eau jusqu'à dissolution. Verser dans un flacon ou une éprouvette avec bouchon de 200 ml et compléter avec l'eau jusqu'à la marque 200 ml.

Attention: L'acide trichloracétique est extrêmement corrosif.

CITRATE TRISODIQUE – SOLUTION à 5%

Citrate trisodique	5 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

DIACÉTYLE-MONOXYME – SOLUTION-MÈRE

Diacétyle-monoxime (également dénommé monoxime 2,3-butanédione)	6,25 g
Eau distillée	q.s.p. 250 ml

Dissoudre le produit dans l'eau. Renouveler la solution chaque mois.

THIOSEMICARBAZIDE – SOLUTION-MÈRE

Thiosémicarbazide	0,63 g
Eau distillée	q.s.p. 250 ml

Dissoudre le produit dans l'eau. Renouveler la solution chaque mois.

DIACÉTYLE-MONOXYME/THIOSEMICARBAZIDE – SOLUTION DÉRIVÉE

Solution-mère de diacétyle-monoxime	24 ml
Solution-mère de thiosemicarbazide	10 ml
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Mélanger les solutions. Renouveler chaque mois.

URÉE – SOLUTION-MÈRE DE RÉFÉRENCE

Urée	0,5 g
Solution aqueuse d'acide benzoïque à 1%	q.s.p. 500 ml

Peser avec la plus grande précision. En utilisant une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre l'urée dans la solution. Bien mélanger.

UREE – SOLUTION DÉRIVÉE DE RÉFÉRENCE

Urée, solution-mère de référence	10 ml
Acide trichloracétique à 10%	50 ml
Solution d'acide benzoïque à 1%	q.s.p. 100 ml

Mesurer très exactement à la pipette. Bien mélanger dans une fiole jaugée de 100 ml.

Attention: L'acide trichloracétique est extrêmement corrosif.

WILLIS – SOLUTION DE (No. 58)

C'est une solution saturée de chlorure de sodium.

Chlorure de sodium	125 g
Eau distillée	500 ml

Dissoudre en chauffant jusqu'à ébullition. Laisser refroidir et reposer.
Vérifier qu'il reste une partie de sel non dissous. Si ce n'est pas le cas, en rajouter environ 50 g. Filtrer et conserver dans un flacon à bouchon de liège.

WINTROBE – SOLUTION OU MÉLANGE DE (No. 59)

Solution anticoagulante.

Oxalate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1,2 g
Oxalate de potassium ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,8 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Placer 0,5 ml de cette solution par flacon de 5 ml d'échantillon de sang.
Laisser sécher les flacons ouverts à température ambiante ou, mieux, à l'incubateur à 37°C.

WRIGHT – COLORANT DE (No. 60)

Colorant de Wright (en poudre)	0,3 g
Glycérine	3 ml
Méthanol	97 ml

ZENKER – FIXATEUR DE (No. 61)

Bichromate de potassium	2,5 g
Chlorure mercurique	5,0 g
Sulfate de sodium	1,0 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Juste avant l'emploi, ajouter à 100 ml de solution:

Acide acétique glacial	5 ml
------------------------------	------

Attention: L'acide acétique glacial est extrêmement corrosif et le chlorure mercurique extrêmement毒ique. Ce fixateur ne doit être préparé que par des techniciens pleinement qualifiés et expérimentés.

ZIEHL-NEELSEN – selon le cas, voir ALCOOL ACIDE (No. 8) ou FUCHSINE PHÉNIQUÉE (No. 30)

VDRL – SOLUTION TAMPON POUR (No. 55)

Phosphate disodique (Na_2HPO_4), anhydre	0,04 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), anhydre	0,17 g
Chlorure de sodium	10,00 g
Eau distillée	1000,00 g
Formol à 37% au moins, neutre, qualité pour réactifs	0,50 ml

Dissoudre les sels dans l'eau distillée, en mettant d'abord le phosphate disodique, puis le phosphate monopotassique, puis le chlorure de sodium et en remuant énergiquement. Ajouter le formol. Vérifier le pH de la solution qui doit être de $6,0 \pm 0,1$. Conserver dans des flacons à bouchons vissés ou à bouchons de verre.

Attention: Le formol est corrosif et toxique.

VIOLET DE GENTIANE – ADAPTATION DE HUCKER (No. 56)

Solution A:

Violet de gentiane (qualité garantie)	2 g
Alcool à 95°	20 ml

Solution B:

Oxalate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,8 g
Eau distillée	80,0 ml

Mélanger les solutions A et B. Laisser reposer 24 heures avant l'emploi.

Verser à travers un papier-filtre dans un flacon pour colorant.

WAYSON – COLORANT DE (No. 57)

Solution A₁:

Fuchsine basique	0,2 g
Méthanol anhydre ("absolu")	10 ml

Solution A₂:

Bleu de méthylène	0,7 g
Méthanol anhydre ("absolu")	10 ml

Combiner les deux solutions pour obtenir la solution A.

Solution B: (solution aqueuse de phénol à 5%)

Phénol	10 g
Eau distillée	200 ml

Ajouter la solution A à la solution B. Les propriétés du colorant de Wayson s'améliorent avec le temps. En préparer en grandes quantités et le répartir dans de petits flacons en verre foncé.

Attention: Le phénol est corrosif.



INDEX

A

ABO, groupage sanguin, 435-436
hématies-tests, réaction sur lame, 443-445, 463
réaction en tube, 446, 463
sérum-tests, réaction sur lame, 437-439
réaction en tube, 440-441
Accidents, 98
précautions à prendre, 101
ACD, solution, 444, 458, 466
Acide acétique à 10%, 175, 331, 334, 466
Acide benzoïque à 0,1%, 429, 471
Acide chlorhydrique, 0,1 mol/l, 377, 466
Acide sulfosalicylique, solution aqueuse à 3%, 345, 466
solution aqueuse à 30%, 313, 466
Acide trichloracétique, à 3%, 429, 471
à 10%, 432, 475
Actinomycètes, 240
Agitateur, fabrication d'un, 66
Aiguilles, 105, 226, 265
nettoyage, 32
ponction d'une veine, 353
pour la réaction au VDRL, 288, 294
stérilisation, 34
Air chaud, four à, 37
Albumine bovine à 20%, 453, 464, 467
Alcool-acide, mélange, 249, 253, 257, 467
modifié, 259
Alcool polyvinyle, 73, 173, 174
Amibes, 73, 148, 150-152
kystes, 157, 158
mobiles, 150-152, 165
Ancylostoma duodenale, 123, 142
larves, 169
œufs, 125, 126, 163
vers, 146
Anguillule, voir *Strongyloides stercoralis*
Anisocytes, 409
Ankylostome, voir *Ancylostoma duodenale* et *Necator americanus*
Annulocytes, 409
Anthrax, bacilles, 239
Anticoagulants, 68-69, 72, 352, 469, 473, 476
Antigène D, 435, 448
répartition géographique, 452
Ascaris, voir *Ascaris lumbricoides*
Ascaris lumbricoides, 123, 142
œufs, 125, 127, 140, 163
vers, 143
Autoclave, 33-35

B

Bacilles, acido-résistants, 249, 252
anthrax, 239
diptérie, 270, 271
Gram négatifs, 240, 244
Gram positifs, 239, 244
lèpre, 252, 259-264
peste, 265-267
tétanos, 239
tuberculose, 249-258, 277
Balances, 48-51
Balantidium coli, kystes, 155, 159
mobiles, 148, 154
Bénédict, méthode de, 311
solution de, 311, 467
Benzidine, réaction à la, 177
Biopsie, matériel pour fixation et expédition, 73, 75-77
Blastocystis, dans les selles, 160
Bleu de crésyl, brillant, 414, 417, 467
Bleu de méthylène, solution aqueuse, 249, 253, 257, 467
solution modifiée, 259
Borrelia, 241
Boucle, fil de métal préparé en forme de, 232
Brugia malayi, 213, 214
Brûlures, acide, 98
alcali, 99
chaleur, 100
Burettes, 46
Bürker, cellule hématimètre de, pour la numération des leucocytes, 364

C

Cabot, anneau de, 410
Caillot, rétraction et temps de lyse, 425-427
Candida, 270, 272, 349
Carbonate de sodium, 98, 467
Cary-Blair, milieu de transport, 265, 268, 468
Cellules blastiques, 404

Cellules cibles, 408, 413
Cellules épithéliales, dans les sédiments urinaires, 329
Cellules polynucléaires, 400-401, 403
Centrifugeurs, 52-55
Chagas, maladie de, voir Trypanosomiase américaine
Champignons, dans les écoulements génito-urinaires, 188
liquide céphalo-rachidien, 349
sédiments urinaires (levures), 328
selles (levures), 160
Chilomastix mesnili, kystes, 158
mobiles, 148, 154
Chlorure de baryum à 10%, solution aqueuse, 317, 468
Choc électrique, 101
Citrate trisodique, solution à 2%, 207, 208
468
solution à 3,8%, 69, 72, 352, 418, 438
468
Clonorchis sinensis, 123
œufs, 125, 128, 141, 163
vers, 146
Coagulation du sang, 352
épreuves de, 421-427
temps de, 423-424
Coccidies, dans les selles, 161
Coccobacilles Gram négatifs, 240
Colorants, Field A et B, 191, 196, 222, 390,
391, 395
Giemsa, 191, 193-195, 196, 207, 209, 218,
222, 230, 241, 390, 391, 393
Gram, 235-237, 238, 242, 244, 253, 270,
275, 348
Jenner, 391
Kinyoun, 257-258
Leishman, 391
May-Grünwald, 193, 390, 393
Romanowsky, 391
Wayson, 265-267
Wright, 391
Ziehl-Neelsen, 238, 242, 249, 253, 259,
262, 264, 275, 349
Compatibilité du sang, épreuve de, 453-455,
463-464
Composés cétoniques dans les urines, 320-321
Concentration, méthodes de, microfilaires,
223-225
parasites dans les selles, 162-169
trypanosomes, 207-208
Coques, Gram négatifs, 244
Gram positifs, 239, 244
Corynebacterium diphtheriae, 270, 271
Crachats, bacille tuberculeux, 249
échantillons de, 254
étalements de, 249-251
expédition de, 71, 255
œufs dans les, 183-184
Cristaux, dans les sédiments urinaires, 332-335
Culots urinaires, cristaux dans les, 332-335
cylindres, 330-332
examen microscopique, 327-335
préparation, 326

D

Densité de l'urine, 307-308
Diabète sucré, 429
Diacétyle-monoxime/thiosemicarbazide, méthode pour le dosage de l'urée, 423-434
Dicrocoelium, 123, 142
œufs, 128, 141, 163
vers, 146
Dientamoeba fragilis, 158
mobiles, 148, 152
Dipetalonema perstans, 213
Dipetalonema streptocerca, 218
Diphtérite, bacille, 271
Diphyllobothrium latum, 123, 142
œufs, 128, 141
Diplocoques, Gram négatifs, 239, 243
Dipylidium caninum, 123, 142
œufs, 129
vers, 145
Donneurs de sang, 81, 458
groupe 0, dangereux, 456-457
registre, 82
Douves, de Chine, voir *Clonorchis sinensis*
du chat, voir *Opisthorchis felineus*
du Japon, voir *Metagonimus yokogawai*
du poumon, voir *Paragonimus westermani*
grande douve de l'intestin, voir *Fasciolopsis buski*
grande douve du foie, voir *Fasciola hepatica*
petite douve, voir *Dicrocoelium*
petite douve d'Orient, voir *Heterophyes heterophyes*
sang, voir *Schistosoma*
Drabkin, diluant de, 371, 468
Drépanocytes, 408, 411-413
Duke, méthode de, pour le temps de saignement, 421-422

E

Eau, déminéralisée, 59
distillée, 57
du laboratoire, 56
pH de l', 58, 60, 61-63
prélèvement pour analyses, 279-284
propre, 56
tamponnée, 61-63, 469
Echinococcus granulosus, 185
Ecouvillons, préparation, 274

F

EDTA, solution de sel dipotassique, 68, 72, 352, 380, 383, 388, 413, 414, 418, 433, 437, 448, 469
Ehrlich, réactif d', 319, 469
Endolimax nana, kystes, 158 mobiles, 148, 152
Entamoeba coli, kystes, 157 mobiles, 150, 151
Entamoeba hartmanni, kystes, 157 mobiles, 152
Entamoeba histolytica, kystes, 155, 157, 159 mobiles, 148, 150, 151
Enterobius vermicularis, 123, 142 œufs, 125, 129, 140 recherche des, 119-121 vers, 143
Eosine, solution aqueuse à 1%, 297, 469 soluté salin à 2%, 147, 469
Eosinophilie, 406
Eosinophiles polynucléaires, 401
Erythrocytes, 351 anormaux, 407-410 dans les sédiments urinaires, 327 voir aussi Erythrocytaire
Erythrocytaire, concentration, 9, 366-370, 384 fraction de volume, 8, 9, 379-385 numération, 9, 366-370, 384 vitesse de sédimentation, 418-420
Etalements pour examen bactériologique, coloration, 234 fixation, 233-234 préparation, 232-233
Examen bactériologique, 231-234
blennoragie, 243-244
coloration, 235-237
expédition d'échantillons de selles pour, 268-269
frottis de gorge, 270-273
lèpre, 259-264
peste, 265-267
prélèvement d'eau, 279-284
syphilis, 246-248
tuberculose, 249-258
urine, 275-278

Fasciola hepatica, 123, 142 œufs, 125, 130, 141, 142, 163 vers, 146
Fasciolopsis buski, 123, 142 œufs, 125, 130, 141, 163 vers, 146
Ferrinitrosopentacyanure de sodium, 320
Field, coloration de, voir Colorants

G

Filiaires, voir Microfilaires
Filaments mycéliens, dans les écoulements génito-urinaires, 188
Fixation, biopsie, 73, 75-77 également mince de sang, 390, 391, 393, 395 étalements sur lames, 233-235, 250, 261, 266 gouttes épaisses de sang, 191
Flagellés, dans les selles, kystes, 158 caractéristiques, 156 mobiles, 148, 153-154, 165 dans les urines, 181
Formol à 10%, 72, 73, 165, 173, 325, 470
Formol citraté, solution, 366, 470
Formol-éther, technique de concentration, 162, 165-167
Formol salin, 73, 75, 470
Fouchet, réactif de, 317, 470
Fournitures, commandes, 86 inventaire, 85 rangement, 85
Fuchs-Rosenthal, cellule de, 343
Fuchsine phéniquée, Kinyoun, 257, 471 Ziehl-Neelsen, 249, 253, 470 modifiée, pour la recherche de bacille de la lèpre, 259

Gamétocytes, 197, 200-201
Giardia lamblia, kystes, 155, 158, 159 mobiles, 148, 153
Giemsia, coloration de, voir Colorants
Globules blancs, voir Leucocytes numération, voir Leucocytaire, concentration
Globules rouges, voir Erythrocytes numération, voir Erythrocytaire, concentration
Glossina, 226
Glucose, dans le liquide céphalo-rachidien, 344, 429 dans le sang, 429-431 dans les urines, méthode de Bénédict, 311 réactifs, pour le dosage du, 429, 471
Gonocoques, 239, 243-244
Gorge, frottis de, examen, 270-271 expédition, 71, 273 préparation des écouvillons, 274
Gram, coloration de, voir Colorants
Grandeur, nouveaux noms de, 7-10
Granulations basophiles, 410
Granulocytes, 403
Grossesse, tests de, 336

H

- Haemophilus influenzae*, 348
Hansen, bacille de, voir *Mycobacterium leprae*
Harada-Mori, technique de concentration parasitaire dans les selles 162, 168-169
Heinz, corps de, 417
Hématocrite, voir Erythrocytaire, fraction de volume
Hémoglobine, concentration, 385
concentration érythrocytaire moyenne, 10, 386
dosage de la cyanméthémoglobin, méthode photométrique, 371-374
dosage par la méthode de Sahli, 377-378
unités de mesure, 371
utilisation d'un comparateur, 375-376
Hémoglobine H, corps de l', 417
Hémoglobine S, 411
Héparine, 69, 380
Heterophyes heterophyes, 123
œufs, 131, 141, 163
vers, 146
Howell-Jolly, corps de, 410
Hymenolepsis diminuta, 123, 142
œufs, 131, 141
Hymenolepsis nana, 123, 142
œufs, 125, 132, 140, 163
vers, 145

- Infections gonococciques, 231, 243-244
Intoxications, 100
Iodamoeba butschli, kystes, 158
mobiles, 148, 152

Jenner, coloration de, voir Colorants

K

- Kala-azar, contrôle de sang, 462
Kinyoun, coloration de, voir Colorants fuchsine phéniquée, 257, 472
Kystes dans les selles, 155-161
apparence microscopique, 157-159
caractéristiques, 156
examen des lames, 155
formes ressemblant à des, 160-161
Kystes ciliés, 155, 158
mobiles, 148, 154

L

- Laboratoire, matériel et équipement, 27, 104-107
péphérique, équipement, 104-107
plan, 102-103
plans, 102-103
registres, 78-83
verrière, 27
nettoyage, 29
préparation, 64
Lactophénol, solution au bleu de coton, 300, 472
Lames, pour examen microscopique, nettoyage, 31
LCR voir Liquide céphalo-rachidien
Lee et White, méthode de, pour le temps de coagulation du sang total, 423-424
Leishman, coloration de, voir Colorants
Leishmania donovani, 462
Lèpre, 259-264
recherche du bacille de la, dans la muqueuse nasale, 264
Leptospira icterohaemorrhagiae dans les urines, 182
Leptospirose, 182
Leucocytaire, concentration 9, 360-365
fraction de nombre, 8, 9, 193, 343, 397-398
Leucocytes, 351
dans le liquide céphalo-rachidien, 342
dans les selles, 160
dans les urines, 327
examen, 398-404
nombre voir Leucocytaire, concentration
numération, 353, 405-406
polynucléaires basophiles, 401
Leucocytose, 364
Leucopénie, 364

- Levures, 240
 écoulements génito-urinaires, 188
 sédiments urinaires, 328
 selles, 160
Liquide céphalo-rachidien, aspect, 340
 champignons dans le, 349
 coloration de Gram, 348
 concentration leucocytaire, 342
 examen microscopique, 347
 expédition, 71, 350
 glucose, dosage du, 344, 429
 méningocoques, 347-348
 pneumocoques, 348
 prélevements, 339
 préparation de Ziehl-Neelsen, 349
 protéines, 345-346
 registres, 80
 trypanosomes, 347
Loa loa, 212, 214
 Loeffler, milieu de culture, 271, 273
 Lovibond, comparateur de type, 61
 Lugol, solution iodée de, 116, 147, 155, 173, 316, 472
 épreuve au, 316-317
Lymphocytes, 401-402, 404
Lymphocytose, 406
Lyse, temps de, 426
Microfilaires sanguines, caractéristiques, 210-214
 coloration, 209
 concentration, 207-208
 espèces, 212-214
 moment propice de la journée pour les prélèvements, 204
 recherche de, à l'état frais, 204-206
Microcytes, 409
Micro-hématocrite, centrifugeur, 208, 224, 379-383
Microscope, 13-26
 éclairage, 16
 entretien, 23
 grossissement, 14
 installation, 18
 mise au point des images, 21
 nettoyage des lames, 31
 précautions, 24
 réglage, 17
 support, 13
MIF, solution, 73, 165, 173, 473
 technique de (concentration parasitaire dans les selles), 162, 167
Moniliase, 272
Monocytes, 402
 paludisme, 202
Monocytose, 406
Mouche Tsé-tsé, voir *Glossina*
"Muguet", 272
Muqueuse nasale, bacille de la lèpre, 264
Mycobacterium leprae, 259
Mycobacterium tuberculosis, 249, 253

M

- Macrocytes**, 409
Maladie du sommeil, voir *Trypanosomiase africaine*
Mansonia ozzardi, 213, 214
Marmite à pression pour stérilisation, 36
Matériel électrique, montage et fonctionnement, 87-93
 May-Grünwald, coloration de, voir *Colorants*
 McArthur, microscope de, 26
Mégacaryocytes, 404
 Mélange alcool-acide, 249, 253, 257, 467
 modifié, 259
 Méningite, 339, 344, 347-350, 429
 Méningocoques, 239
 dans le liquide céphalo-rachidien, 346
 Métabisulfite de sodium, solution aqueuse à 2%, 411, 473
Metagonimus yokogawai, 123
 œufs, 132, 141, 163
 vers, 146
 Méthylène, bleu de, voir Bleu de méthylène
Microfilaires, cutanées, 215-219
 dans le suc ganglionnaire, 230
 dans les urines, 181, 182
 dans l'oeil, 219

N

- Necator americanus*, 123, 142
 œufs, 125, 132, 140, 163
 vers, 146
Neisseria gonorrhoea, 243
Neubauer, cellule de, pour la numération des leucocytes, 363, 368
Neutropénie, 406
Neutrophiles, polynucléaires, 400
Neutrophilie, 406
 Nitrate d'argent, solution à 1,7%, 58, 473
 Nitrosoferricyanure de sodium voir Ferrinitrosopentacyanure de sodium
Normoblastes, 364, 403, 408

O

Oeufs, dans les crachats, 183-184
dans les selles, apparence
 microscopique, 121, 126-137, 140-141
caractéristiques, 125
liste alphabétique, 123
méthodes de concentration, 163-169
termes utilisés, 124
dans les urines, 178-180
Onchocerca volvulus, 215
 caractéristiques, 215
dans les urines, 181
Onchocercose, 215-219
Opisthorchis felineus, 123
 œufs, 133, 141, 163
vers, 146
Orthotoluidine, méthode pour le dosage
 du glucose, 429-431
réactif, 429, 473
Ovalocytes, 410
Oxalate, fluorure d', 341, 344, 352, 429, 473
Oxyure, voir *Enterobius vermicularis*

P

Paludisme, dans le sang des donneurs, 462
densité parasitaire, 198, 203
identification, 200-202
parasites du, 196-203
préparation des étalements de sang, 196
 étalements minces, 387-390
 goutte épaisse, 189-192
répartition géographique, 199
stades de développement, 197
Pandy, réactif de, 346, 473
Paragonimus westermani, 132
 œufs, 125, 133, 141, 163, 183-184
Parasites, 111
 concentration dans les selles, 162
 dans les urines, 178-182
 voir aussi les noms des différents organismes
Pasteurella pestis voir *Yersinia pestis*
Peau, lésions dues au bacille de la lèpre,
 259-262
Peste, 265-267
pH, mesure du, de l'eau, 60, 61-63
 de l'urine, 309-310
Pian, 246, 247, 287, 288
Pigments biliaires dans les urines, 316-318
Pinta, 288

Pipettes, 43
compte-gouttes, 46
Pasteur, 64, 246
rinçage, 30
Pityriasis versicolor, examen direct, 297-299
Pityrosporum furfur, 297
Plaquettes sanguines voir Thrombocytes
Plasma sanguin, 352
Plasmocytes, 402
Plasmodium, 199-202
Plomberie, opérations simples, 94-97
Poïkilocytes, 409
Polynucléaire neutrophile unilobe, 400
Ponction de sang veineux, 353-358, 458-461
Potasse, solution à 20%, 300, 473
Prélèvements, destruction, 39, 41
 emballages, 74
 enregistrement, 78
 expédition, 71-73
Premiers secours, 98-101
Protéines, dans le liquide céphalo-rachidien,
 345-346
 dans les urines, 313-315
Protozoaires, 113, 142
 formes mobiles dans les selles, 147-154
 caractéristiques, 149
 examen microscopique, 150-154
 lames, 147
 kystes, 155-159
 voir aussi les noms des différents
 organismes
Pus, dans les selles, 161
uréthral, 71, 243-245
 examen, 243
 expédition des prélèvements, 71, 245
PVA, voir Alcool polyvinyle

R

Rapports, examens bactériologiques, 242
 examens de selles, 172
 mensuels, du laboratoire, 84
Réactif acide, 432, 466
Réactif neutre, 432, 467
Réactifs, préparation des, 465-477
Récipients pour les prélèvements, 68-73
 biopsies, 73, 76
 crachats, 70-71, 255
 eau, 279
 destruction du matériel souillé et
 stérilisation, 39-41
 frottis de gorge, 71, 273
 liquide céphalo-rachidien, 71, 350
 pus, 71, 245-246
 sang, 68-69, 72, 285-287, 461
 selles, 72-73, 114, 268
 urines, 73, 305

Registres, 78-83
analyses d'urines 80-81
chimie sanguine, 79
donneurs de sang, 82
hématologie, 79
liquide céphalo-rachidien, 80-81
parasitologie, 83
sérologie, 83
transfusion sanguine, 80-81
Réticulocytes, numération, voir Réticulo-cytaire,
Réticulocytaire, concentration, 9, 416
fraction de nombre, 9, 416
Rhésus, groupes sanguins, 435-436
réaction en tube, 451-452
réaction sur lame, 448-450
Romanowsky, coloration de, voir Colorants
Rouleaux, formation de, 442, 450, 455

S

Safranine, solution, 235, 244, 474
Saignement, temps de, 421-422
Salmonella, 268
Sang, coagulation, 352
épreuve, 421-427
compatibilité, 453-455, 463-464
donneurs de, 81, 458
groupe O, dangereux, 456-457
registres, 82
dosage du glucose, 429-431
dosage de l'urée, 432-434
étalements minces, coloration, 391-396
fixation, 390
préparation, 387-390
expédition, 72, 285-287
groupages, 435-436
plan de travail, 463-464
Rhésus, 448-452
système ABO, 437-447
liquide céphalo-rachidien dans le, 340
prélèvement de sang capillaire, 189-190,
358, 388
veineux, 353-358, 437, 458-461
préparation d'une goutte épaisse, 189-191
coloration, 191-195
recherche chimique de, dans les selles,
175-177
recherche dans les urines, 337
séché, 287
transfusion, 435-467
Saprophytes, 238, 239, 241, 244
Schistosoma bovis, 123, 142
œufs, 133, 163
vers, 146
Schistosoma haematobium, 123, 142
œufs, 125, 134, 140, 163, 178-180, 332
vers, 146

Schistosoma intercalatum, 123, 142
œufs, 134, 141, 163
vers, 146
Schistosoma japonicum, 123, 142
œufs, 125, 135, 141, 163
vers, 146
Schistosoma mansoni, 123, 142
œufs, 122, 125, 135, 140, 163, 180
vers, 146
Schizonte, 197, 200-201
Scolex hydatique, 185
Selles, concentration parasitaire, 162-169
examen, 113, 170-172
expédition, 72-73, 173-174, 268-269
obtention des échantillons, 114
protozoaires, 146-161
sang, recherche de, 175-177
vers, adultes, 143-146
œufs, 122-141
Seringues, 105
stérilisation, 34
Sérum sanguin, 352
coloration, sang des donneurs, 457
conservation, 286
expédition, 286
prélèvement, 285-286
Shigella, 268
Simulium, 215
Soluté physiologique, à 0,85%, 116, 121,
147, 155, 165, 186, 204, 209, 215, 220,
226, 264, 265, 268, 437, 453, 463, 474
Soluté salin tamponné glycériné, 72, 269, 474
Solution ACD, 444, 458, 466
Solution sulfo-chromique pour le nettoyage
du matériel, 30, 369, 474
Soude, solution aqueuse à 3%, 183, 474
à 10%, 178, 474
Spermatozoïdes, dans les urines, 329
Sphérocytes, 409
Spirochètes, 182, 241, 246-248, 272
Staphylocoques, 239
Stérilisation, 33-38
Streptocoques, 239
Strongyloides stercoralis, 123, 142
larves, 136, 140, 163, 168-169
œufs, 125, 136, 141
Stuart, milieu de transport, adaptation,
246, 273, 350, 474
Syphilis, 246-248, 287, 288

T

Taenia saginata, 123, 142
œufs, 125, 137, 140, 163
vers, 144, 145
Taenia solium, 123, 142
œufs, 125, 137, 140, 163
vers, 144, 145
Teignes, examen direct, 300-302

Ténia des poissons, *voir Diphyllobothrium latum*
du bœuf, *voir Taenia saginata*
du chien, *voir Dipylidium caninum*
du porc, *voir Taenia solium*
du rat, *voir Hymenolepsis diminuta*
nain, *voir Hymenolepsis nana*
Tétanos, bacilles, 239
Thiosemicarbazide, réactif, 432, 474
Thiosulfate de sodium, solution aqueuse à 3%, 279, 475
Thrombocytaire, concentration, 9, 351
Thrombocytes (plaquettes), 203, 351, 398, 426
numération des, *voir Thrombocytaire, concentration*
Transfusion sanguine, 435-464
Transgrow, milieu de transport, 71, 245, 273, 350
Transport, milieux de, pour échantillons de crachats, 255
échantillons de selles, 268-269
gonocoques, 245-246
liquide céphalo-rachidien, 350
prélèvements de gorge, 273
Treponema pallidum, 246, 462
Treponema pertenue, 246
Treponema vincentii, 241, 272
Trichocéphale, *voir Trichuris trichiura*
Trichomonas hominis, forme mobile, 148, 153
Trichomonas vaginalis dans les écoulements génito-urinaires, 186-187
sédiments urinaires, 329
urines, 181
Trichostrongylides, 123, 142
œufs, 137, 141
Trichuris trichiura, 123, 142
œufs, 125, 137, 140
vers, 146
Trophozoïte, 197, 200-201
Trypanosoma cruzi, 225, 462
Trypanosoma gambiense, 222
Trypanosoma rangeli, 225
Trypanosoma rhodesiense, 222
Trypanosomes, caractéristiques, 221, 222, 225, 229, 230
dans le liquide céphalo-rachidien, 347
dans le sang, 220-224, 287, 462
dans la sérosité ganglionnaire, 226-230
Trypanosomiase africaine, 220, 226
américaine, 220, 225
Tuberculose, 231, 249-258
Türk, solution de, 342, 360, 475

U

Unités SI, 6-10
Urée, dosage de l', 432-434
réactifs, 432, 475

Urines, analyses, registre d', 80
aspect, 306
bacilles tuberculeux, 277
composés cétoniques, 320-322, 324
cultures, 278
densité, 307-308
examen bactériologique direct, 275-277
glucose, 311-312, 323
obtention d'échantillons, 275, 305-306
parasites, 178-182
pH, 309-310
pigments biliaires, 316-318
protéines, 313-315, 323
sang, 337
tests de grossesse, 336
urobilinogène, 319, 324
utilisation de papiers indicateurs, 323-324
Urobilinogène, 319, 324

V

VDRL, réaction du, 248, 288
épreuve qualitative, 291-293
épreuve quantitative, 294-296
préparation de la suspension antigénique, 288
solution tampon, 289, 476
Verre, préparation d'une pissette en, 67
Verrerie, 27-32, 34, 37, 64-67, 105, 369-370
Vers adultes, dans les selles, 143-146
voir aussi Oeufs
Vibrios cholériques, 72, 268, 269
Vincent, angine de, 241, 272
Violet de gentiane, adaptation de Hucker, 235, 476
Volume, mesures de, 42-47
VS, *voir Erythrocytaire, vitesse de sémentation*

W

Wayson, coloration de, *voir Colorants*
Willis, solution de, 163, 476
concentration parasitaire, 162, 163-164
Wintrobe, mélange de, 352, 383, 476
Wright, coloration de, *voir Colorants*
Wuchereria bancrofti, 212, 214
dans les sédiments urinaires, 332
dans les urines, 181

Y

Yersinia pestis, 265, 267

Z

Ziehl-Neelsen, coloration de, voir Colorants
Zenker, fixateur de, 73, 75, 476

